



**RENORBIO**

**Programa de Pós-graduação em Biotecnologia**

**EFEITO DA ADIÇÃO DE ANTIOXIDANTES AO GRADIENTE  
CONTÍNUO DE DENSIDADE DE PERCOLL E AO DILUIDOR  
DE CONGELAÇÃO SOBRE OS ESPERMATOZOIDES  
CAPRINOS SELECIONADOS E CONGELADOS**

**Ellen Cordeiro Bento da Silva**

**Recife - PE**

**2014**



**RENORBIO**

**Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia  
Ponto focal de Recife-PE**

**EFEITO DA ADIÇÃO DE ANTIOXIDANTES AO GRADIENTE CONTÍNUO DE  
DENSIDADE DE PERCOLL E AO DILUIDOR DE CONGELAÇÃO SOBRE OS  
ESPERMATOZOIDES CAPRINOS SELECIONADOS E CONGELADOS**

**Ellen Cordeiro Bento da Silva**

**Recife - PE**

**2014**



**RENORBIO**

**Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia  
Ponto focal de Recife-PE**

**EFEITO DA ADIÇÃO DE ANTIOXIDANTES AO GRADIENTE CONTÍNUO DE  
DENSIDADE DE PERCOLL E AO DILUIDOR DE CONGELAÇÃO SOBRE OS  
ESPERMATOZOIDES CAPRINOS SELECIONADOS E CONGELADOS**

**Ellen Cordeiro Bento da Silva**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (PPGB), como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia em agropecuária

Linha de pesquisa: Conservação e multiplicação de germoplasma

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Madalena Pessoa Guerra.

**Recife - PE**

**2014**

Ficha Catalográfica

S586e Silva, Ellen Cordeiro Bento da  
Efeito da adição de antioxidantes ao gradiente contínuo de densidade de percoll e ao diluidor de congelação sobre os espermatozoides caprinos seleccionados e congelados / Ellen Cordeiro Bento da Silva. -- Recife, 2014.  
130 f. : il.

Orientador (a): Maria Madalena Pessoa Guerra.  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2014.  
Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio).  
Referência.

1. Criopreservação 2. Estilbenos 3. Estresse oxidativo  
4. Flavonoides 5. Gradiente de densidade I. Guerra, Maria Madalena Pessoa, Orientador II. Título

CDD 620.8


**Ellen Cordeiro Bento da Silva**


**Efeito da adição de antioxidantes ao gradiente contínuo de densidade de Percoll e ao diluidor de congelação sobre os espermatozoides caprinos seleccionados e congelados**

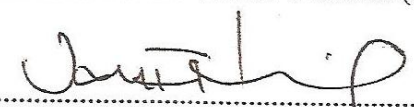
Tese apresentada a Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.


Área de concentração: Biotecnologia em agropecuária

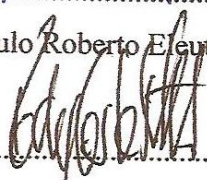
**Aprovado em 26 de fevereiro de 2014 por:**

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

  
.....  
1º Examinador: Profª Drª Aurea Wischral (UFRPE)

  
.....  
2º Examinador: Profª Drª Vera F.M. Hossepian de Lima (UNESP)

  
.....  
3º Examinador: Prof Dr Paulo Roberto Eutério de Souza (UFRPE)

  
.....  
4º Examinador: Prof Dr Rodrigo Costa Mattos (UFRGS)

Recife – PE

2014

A Deus por ter me dado à graça da sabedoria, da persistência, da esperança, da humanidade, da coragem e da simplicidade, bem como a minha família, amigos e a minha professora e orientadora Maria Madalena, anjos que acreditaram em mim e que nunca me abandonaram; mesmo nas horas mais difíceis de minha vida.

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pai amado que me concedeu o dom da vida e a oportunidade de ser concebida em meio uma família tão especial. Agradeço por ter me feito uma guerreira, assim como minha avó e minha mãe; mulheres que me ensinaram a não desistir nunca. Mulheres estas que me ensinaram a crer no amor de um Deus maravilhoso, que nunca abandona os seus.

Agradeço pelo amor da minha família que, apesar de todas as nossas diferenças, sempre esteve ao meu lado. Muitos se foram, se fizeram ausentes, mas estes nunca. Estes sempre estiveram ao meu lado e é a eles a quem rendo a maior gratidão. Minha mãe, meu pai e meus irmãos. Foram estes que me sustentaram nas horas mais difíceis desta etapa, que agora findo em minha vida. Foram estes quem sonharam comigo o meu sonho, apesar de muitas vezes acharem ser loucura, apesar de muitas vezes terem considerado este um fardo pesado demais para que eu carregasse. E assim sendo, Eles estiveram sempre ao meu lado carregando-o comigo.

Muitos risos e muitas lágrimas rolaram de meu rosto durante a preparação desta tese e foram estes anjos de Deus que sempre estiveram comigo, me erguendo e me carregando no colo nas horas mais difíceis. Foram eles que ultrapassaram suas limitações para me auxiliar durante toda a minha vida.

Agradeço também aos meus queridos e amados tios pelo apoio, compreensão e amor.

Agradeço aos meus antigos e novos amigos de laboratório Helder, Lúcia, Juliana, Joane, Igor, Sildivane, Thalles, Robespierre, Chirlane, Jobson, Diogo, Lígia, Zoraide, Karen, Cristiane, Andreia, Marina, Daniela..., enfim, a todos, não apenas pela ajuda nas atividades experimentais, mas por tantos sorrisos soltos nesse ambiente onde passei boa parte de minha vida.

Agradeço por todos os anjos que o Senhor coloca em minha vida, ao longo desses quase trinta anos. Entre estes, não poderia deixar de citar os professores Fabrício de Sá, Valdomiro Jr, Maria José, Manoel, Aurea, Paulo Souza e Vera Hossepian, a Joana, Alcir, Humberto, D. Sônia, Marquinhos, Leo, Manoel, Severino, Serginho, Marcelo, Diogo, Ana Lisa, Atzel.... Agradeço a todos estes que iluminaram meus caminhos e me ajudaram, à vista de muitos, com coisas vãs, mas para mim de imensa grandeza porque foram feitas com carinho, com amor.

Agradeço, principalmente, a todos aqueles que me ajudaram a superar minhas dificuldades, todos aqueles que me deram uma mão amiga, orientação, atenção e carinho. A estes (professor Manoel, professor Paulo Souza, professora Aurea, Carliane, Joane e Diogo) não poderia deixar de dar meus eternos agradecimentos por terem ficado ao meu lado no momento mais difícil que passei durante este doutorado.

Agradeço a minha orientadora, pessoa tão batalhadora e humana, com a qual tive a honra de conviver e trabalhar durante quase oito anos. Agradeço por ter acreditado em mim, naquela menina mirrada e medrosa, a quem ajudou a transformar e formar.

Espero em Deus que o meu jardim da vida ainda possa cultivar muitas dessas tão belas flores e que se encha mais e mais de cores e de luz.

Agradeço, por fim, aos órgãos de fomento FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo suporte financeiro, bem como à RENORBIO (Rede Nordeste de Biotecnologia).

Agradeço novamente a Deus por nunca ter me desamparado nas horas difíceis e por cada vez que me fez cair, como uma criança levada, a fim de me lembrar de que não sou perfeita e nem melhor do que nenhum de meus irmãos. Obrigada meu Senhor por todas as graças concebidas em minha vida. Graças essas que não se resumem a bonança, mas também às horas difíceis porque o aprendizado está em todas as coisas.



Quem vive em um ambiente de amor e luz não tem nada que o falte, nada que o subtraia, mas apenas que o acrescente.

**(Ellen C.B. da Silva, por inspiração Divina)**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

-EO: não portador de estresse oxidativo

+EO: portador de estresse oxidativo

-OH: grupo hidroxila

ACP: água de coco em pó

ALH: amplitude de deslocamento lateral de cabeça

aMOR: espermatozoide morfologicamente anormal

BCF: frequência de batimento flagelar cruzado

BSA: albumina sérica bovina

C0: catequina 0  $\mu\text{M}$

C15: catequina 15  $\mu\text{M}$

C25: catequina 25  $\mu\text{M}$

C50: catequina 50  $\mu\text{M}$

C75: catequina 75  $\mu\text{M}$

C100: catequina 100  $\mu\text{M}$

$\text{Ca}^{2+}$ : íon cálcio

Ci: concentração espermática inicial

Cf: concentração espermática recuperada

COX: ciclooxigenase

DCF: diacetato de carboxifluoresceína

DCF+/AnV-: célula intacta

DCF+/AnV+: célula apoptótica

DCF-/AnV+: célula morta.

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle medium

dMP: membrana plasmática danificada

EGCG: epigallocatequina galato

FITC-PNA: isotiocianato de fluoresceína conjugado a *Peanut agglutinin*

$\text{H}_2\text{O}_2$ : peróxido de hidrogênio

IA: inseminação artificial

iAC: integridade do acrossoma

iMP: integridade de membrana plasmática

IP: iodeto de propídio

JC-1: 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil-carbocianine iodide

LIN: linearidade

LOX: lipoxigenase

MP: motilidade progressiva

MT: motilidade total

NBT: nitroblue tetrazolium

nMOR: morfologia normal

NS: não selecionado

NSc: não selecionado e congelado

$O_2^{\cdot -}$ : ânion superóxido

$OH^{\cdot}$ : radical hidroxila

$ON^{\cdot}$ : óxido nítrico

$ONOO^-$ : peroxinitrito

PBS: solução salina tamponada

PLC: fosfolipase C

R0: resveratrol 0  $\mu$ M

R15: resveratrol 15  $\mu$ M

R25: resveratrol 25  $\mu$ M

R50: resveratrol 50  $\mu$ M

R75: resveratrol 75  $\mu$ M

R100: resveratrol 100  $\mu$ M

rAC: acrossoma reagido

RNS: espécies reativas ao nitrogênio

ROS: espécies reativas ao oxigênio

S: selecionado

Sc: selecionado e congelado

SC75: selecionado com 75  $\mu$ M de catequina

SC75c: selecionado com 75  $\mu$ M de catequina e congelado

SE100: selecionado com 100  $\mu$ M de EGCG

SE100c: selecionado com 100  $\mu$ M de EGCG e congelado

SQ25: selecionado com 25  $\mu$ M de quercetina

SQ25c: selecionado com 25  $\mu$ M de quercetina e congelado

SR25: selecionado com 25  $\mu$ M de resveratrol

SR25c: selecionado com 25  $\mu\text{M}$  de resveratrol e congelado

SR75: selecionado com 75  $\mu\text{M}$  de resveratrol

SR75c: selecionado com 25  $\mu\text{M}$  de resveratrol e congelado

STR: retilinearidade

Tr: taxa de recuperação

VAP: velocidade média da trajetória

VCL: velocidade curvilínea

Vf: volume recuperado (final) da amostra

Vi: volume inicial da amostra

VSL: velocidade linear progressiva

WOB: oscilação

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Revisão de literatura</b>	
<b>Figura 1 -</b> Diagrama com as diferenças no conteúdo de DNA entre os cromossomos sexuais X e Y em diferentes espécies.....	<b>21</b>
<b>Figura 2 -</b> Diagrama esquemático do processo de sexagem de espermatozoides em citômetro de fluxo.....	<b>23</b>
<b>Figura 3 -</b> Diagrama esquemático do processo de centrifugação de espermatozoides em gradiente contínuo de densidade de Percoll.....	<b>26</b>
<b>Figura 4 -</b> Estrutura química da (+)-catequina e (-)-epigalocatequina galato.....	<b>36</b>
<b>Figura 5 -</b> Estrutura química do flavonoide quercetina.....	<b>38</b>
<b>Figura 6 -</b> Estrutura química dos isômeros cis (A) e trans-resveratrol (B)..	<b>40</b>
<b>Experimento 1</b>	
<b>Figura 1 -</b> Análise microscópica dos espermatozoides.....	<b>80</b>
<b>Experimento 2</b>	
<b>Figura 1 -</b> Análise microscópica dos espermatozoides.....	<b>100</b>
<b>Experimento 3</b>	
<b>Figura 1 -</b> Esquematização do processo de preparação dos gradientes contínuos de densidade de Percoll e da centrifugação do sêmen nos mesmos.....	<b>128</b>
<b>Figura 2 -</b> Análise microscópica dos espermatozoides.....	<b>129</b>

## LISTA DE TABELAS

Página

### Experimento 1

- Tabela 1 -** Parâmetros cinéticos (Média  $\pm$  DP) de amostras seminais caprinas congeladas em diluidor à base de leite desnatado (7% glicerol), adicionado de diferentes concentrações de (+)-catequina (0, 15, 25, 50, 75 e 100  $\mu$ M) e avaliadas 0 e 1 h após descongelação..... **76**
- Tabela 2 -** Parâmetros cinéticos (Média  $\pm$  DP) de amostras seminais caprinas congeladas em diluidor à base de leite desnatado (7% glicerol), adicionado de diferentes concentrações de EGCG (0, 15, 25, 50, 75 e 100  $\mu$ M) e avaliadas 0 e 1 h após descongelação..... **77**
- Tabela 3 -** Integridade de membrana plasmática e acrossomal, morfologia normal e estresse oxidativo negativo (Média  $\pm$  DP) de amostras de sêmen caprino congeladas em diluidor à base de leite desnatado (7% glicerol), adicionado de diferentes concentrações de (+)-catequina (0, 15, 25, 50, 75 e 100  $\mu$ M) e avaliadas nos tempos 0 e 1 h após descongelação..... **78**
- Tabela 4 -** Integridade de membrana plasmática e acrossomal, morfologia normal e estresse oxidativo negativo (Média  $\pm$  DP) de amostras de sêmen caprino congeladas em diluidor à base de leite desnatado (7% glicerol), adicionado de diferentes concentrações de EGCG (0, 15, 25, 50, 75 e 100  $\mu$ M) e avaliadas nos tempos 0 e 1 h após descongelação..... **79**

## Experimento 2

- Tabela 1 -** Parâmetros cinéticos (Média  $\pm$  DP) de amostras seminais caprinas congeladas em diluidor à base de leite desnatado (7% glicerol), adicionado de diferentes concentrações de resveratrol (0, 15, 25, 50, 75 e 100  $\mu$ M) e avaliadas 0 e 1 h após descongelação..... **96**
- Tabela 2 -** Parâmetros cinéticos (Média  $\pm$  DP) de amostras seminais caprinas congeladas em diluidor à base de leite desnatado (7% glicerol), adicionado de diferentes concentrações quercetina (0, 15, 25, 50, 75 e 100  $\mu$ M) e avaliadas 0 e 1 h após descongelação..... **97**
- Tabela 3 -** Integridade de membrana plasmática e acrossomal, morfologia normal e estresse oxidativo negativo (Média  $\pm$  DP) de amostras de sêmen caprino congeladas em diluidor à base de leite desnatado (7% glicerol), adicionado de diferentes concentrações de resveratrol (0, 15, 25, 50, 75 e 100  $\mu$ M) e avaliadas nos tempos 0 e 1 h após descongelação..... **98**
- Tabela 4 -** Integridade de membrana plasmática e acrossomal, morfologia normal e estresse oxidativo negativo (Média  $\pm$  DP) de amostras de sêmen caprino congeladas em diluidor à base de leite desnatado (7% glicerol), adicionado de diferentes concentrações de quercetina (0, 15, 25, 50, 75 e 100  $\mu$ M) e avaliadas nos tempos 0 e 1 h após descongelação..... **99**

### Experimento 3

- Tabela 1 -** Parâmetros cinéticos (Média  $\pm$  DP) de amostras de sêmen caprino *in natura* não selecionadas ou selecionadas em gradientes contínuos de densidade de Percoll, adicionados ou não de antioxidantes..... **124**
- Tabela 2 -** Integridade de membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial, integridade de acrossomal, morfologia espermática e taxa de recuperação espermática (Média  $\pm$  DP) de amostras de sêmen caprino *in natura* não selecionadas ou selecionadas em gradientes contínuos de densidade de Percoll, adicionados ou não de antioxidantes..... **125**
- Tabela 3 -** Parâmetros cinéticos (Média  $\pm$  DP), após descongelação, de amostras de sêmen caprino não selecionadas ou selecionadas em gradientes contínuos de densidade de Percoll, adicionados ou não de antioxidantes, e congeladas em diluidor à base de leite desnatado (7% glicerol), na presença ou não destes agentes..... **126**
- Tabela 4 -** Integridade de membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial, integridade de acrossomal, morfologia espermática e taxa de recuperação (Média  $\pm$  DP), após descongelação, de amostras de sêmen caprino não selecionadas ou selecionadas em gradientes contínuos de densidade de Percoll, adicionados ou não de antioxidantes, e congeladas em diluidor à base de leite desnatado (7% glicerol), na presença ou não destes agentes..... **127**



## RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito de diferentes concentrações de antioxidantes fenólicos sobre a congelabilidade de espermatozoides caprinos, bem como a ação destes durante a centrifugação em gradientes contínuos de densidade de Percoll e após congelação do sêmen selecionado. Foram utilizados seis *pools* de sêmen caprino por experimento. Nos dois primeiros experimentos cada *pool* de sêmen foi processado e diluído em meio à base de leite desnatado (7% glicerol), acrescido ou não de antioxidantes, de acordo com o experimento e o grupo experimental [Experimento 1: 0, 15, 25, 50, 75 ou 100  $\mu\text{M}$  de catequina ou de epigallocatequina galato (EGCG); Experimento 2: 0, 15, 25, 50, 75 ou 100  $\mu\text{M}$  de resveratrol ou de quercetina]. No terceiro experimento, cada *pool* de sêmen foi centrifugado em gradiente contínuo de densidade de Percoll e congelado, de acordo com o grupo experimental (NS=não selecionado; S=selecionado; SC75=selecionado com 75  $\mu\text{M}$  de catequina; SE100=selecionado com 100  $\mu\text{M}$  de EGCG; SQ25=selecionado com 25  $\mu\text{M}$  de quercetina; SR25=selecionado com 25  $\mu\text{M}$  de resveratrol; SR75=selecionado com 75  $\mu\text{M}$  de resveratrol). No Experimento 1, imediatamente após a descongelação, as velocidades linear progressiva (VSL) e média da trajetória (VAP) foram superiores ( $P<0,05$ ) no grupo tratado com 15  $\mu\text{M}$  de catequina do que com 50 e 100  $\mu\text{M}$ ; a oscilação (WOB) foi maior ( $P<0,05$ ) com 0, 15 e 25  $\mu\text{M}$  de catequina do que com 100  $\mu\text{M}$ ; e o batimento flagelar cruzado (BCF) foi maior ( $P<0,05$ ) com 75 e 100  $\mu\text{M}$  de catequina do que com 0  $\mu\text{M}$ . A motilidade progressiva (MP) foi maior ( $P<0,05$ ) com 0 e 15  $\mu\text{M}$  de EGCG do que com 50 e 75  $\mu\text{M}$  e a linearidade (LIN) foi maior ( $P<0,05$ ) com 0  $\mu\text{M}$  de EGCG do que com 100  $\mu\text{M}$ . No Experimento 2, a WOB foi maior ( $P<0,05$ ) com 0 e 25  $\mu\text{M}$  de resveratrol ou 0  $\mu\text{M}$  de quercetina do que com 100  $\mu\text{M}$ , imediatamente após a descongelação. Para o Experimento 3, a MP, LIN, retilinearidade (STR) e WOB dos grupos selecionados em gradientes de Percoll foram maiores ( $P<0,05$ ) do que as do NS; nos grupos SC75, SR25 e SR75 a VSL foi maior ( $P<0,05$ ) do que no NS; a amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH) foi maior ( $P<0,05$ ) no grupo NS do que nos demais e o SQ25 reduziu ( $P<0,05$ ) o potencial de membrana mitocondrial, em relação aos demais grupos. Após descongelação do sêmen, a MP, LIN, WOB, VSL e VAP foram maiores ( $P<0,05$ ) nos grupos selecionados do que no NS, com exceção do SE100 e SQ25; o SC75 teve maior ( $P<0,05$ ) STR do que o NS; a ALH foi menor ( $P<0,05$ ) nos grupos S, SC75, SR25 e SR75 do que no NS; e o BCF foi menor no S do que no NS. A integridade de membrana plasmática foi maior ( $P<0,5$ ) nos grupos selecionados do que no NS, com exceção do SE100; a porcentagem de células intactas e de não mortas foi maior ( $P<0,05$ ) nos grupos selecionados do que no NS. Conclui-se que altas concentrações (50 a 100  $\mu\text{M}$ ) de catequina e EGCG inibem a cinética de espermatozoides congelados de caprinos, em caráter transitório, e que o resveratrol e a quercetina não têm qualquer influência sobre a congelabilidade do sêmen caprino. Por outro lado, a seleção de espermatozoides em gradientes contínuos de densidade de Percoll é uma metodologia viável para a espécie caprina e compatível com o processo de congelação; independente da terapian antioxidante usada.

**Palavras-chave:** criopreservação, estilbenos, estresse oxidativo, flavonoides, gradiente de densidade.

## ABSTRACT

It was aim to evaluate the effect of different concentrations of phenolic antioxidants on freezability of goats sperm, as well as their action during centrifugation in continuous Percoll density gradients and after selected semen freezing. Six goat semen *pools* were used for each of the three experiments. In the first two experiments, each semen *pool* was processed and diluted in the skimmed milk based extender (7 % glycerol), with or without antioxidants, according to experiment and experimental group [1 Experiment: 0, 15, 25, 50, 75 or 100  $\mu\text{M}$  catechin or epigallocatechin gallate (EGCG); Experiment 2: 0, 15, 25, 50, 75 or 100  $\mu\text{M}$  resveratrol or quercetin]. In Experiment 3, each semen *pool* was centrifugated in continuous Percoll density gradients and frozen (with or without antioxidants) according to experimental groups (NS=non selected; S= selected; SC75= selected with 75  $\mu\text{M}$  catechin; SE100= selected with 100  $\mu\text{M}$  EGCG; SQ25=selected with 25  $\mu\text{M}$  quercetin; SR25=selected with 25  $\mu\text{M}$  resveratrol; SR75=selected with 75  $\mu\text{M}$  resveratrol). In Experiment 1, immediately after thawing, the straight linear velocity (VSL) and average path velocity (VAP) were greater ( $P<0.05$ ) in 15  $\mu\text{M}$  catechin than in 50 and 100  $\mu\text{M}$ ; wobble (WOB) was higher ( $P<0.05$ ) in catechin 0, 15 and 25  $\mu\text{M}$  than in 100  $\mu\text{M}$ ; beat cross frequency (BCF) was higher ( $P<0.05$ ) in 75 and 100  $\mu\text{M}$  catechin than in 0  $\mu\text{M}$ . Progressive motility (PM) was greater ( $P<0.05$ ) with 0 and 15  $\mu\text{M}$  EGCG than with 50 and 75  $\mu\text{M}$ ; and linearity (LIN) was higher with 0  $\mu\text{M}$  EGCG than with 100  $\mu\text{M}$ . In Experiment 2 WOB was higher ( $P<0.05$ ) in 0 and 25  $\mu\text{M}$  resveratrol or 0  $\mu\text{M}$  quercetin than 100  $\mu\text{M}$ , immediately after thawing. In Experiment 3, immediately after sexing, PM, LIN, straightness (STR) and WOB from sexed groups were higher ( $P<0.05$ ) than those from NS; SC75, VSL was higher ( $P<0.05$ ) in SR25 and SR75 than in NS; amplitude of lateral movement of the head (ALH) was higher ( $P<0.05$ ) in the NS than in other groups. SQ25 reduced ( $P<0.05$ ) the mitochondrial membrane potential, compared to other groups. After thawing, PM, LIN, WOB, VSL and VAP were higher ( $P<0.05$ ) in sexed groups than in NS, except to SE100 and SQ25; SC75 had greater ( $P<0.05$ ) STR than NS; ALH was lower ( $P<0.05$ ) in S, SC75, SR25 and SR75 than in NS; BCF was lower ( $P<0.05$ ) in S than in NS; plasma membrane integrity was higher ( $P<0.05$ ) in sexed groups than in NS, except to SE100; the percentage of intact and not dead cells was greater ( $P<0.05$ ) in sexed groups than in NS. We concluded that, under the experimental conditions used, high concentrations (50 to 100  $\mu\text{M}$ ) of catechin inhibit the kinematics of frozen goat sperm in transitory way, and that resveratrol does not have any influence on goat semen freezability. Moreover, sex selection in continuous Percoll density gradients is feasible methodology to goats and compatible with freezing process; independent of antioxidant therapy used.

**Keywords:** cryopreservation, stilbenes, oxidative stress, flavonoids, sex selection.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Biotecnologias do sêmen.....</b>	<b>19</b>
2.1.1 Sexagem espermática.....	19
2.2.2 Congelação de sêmen.....	28
<b>2.2 Espécies reativas de oxigênio (ROS) e danos oxidativos.....</b>	<b>31</b>
<b>2.3 Terapias antioxidantes.....</b>	<b>33</b>
2.3.1 Compostos fenólicos.....	34
<b>3 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>42</b>
<b>4 EXPERIMENTOS.....</b>	<b>59</b>
<b>4.1 (+)-Catequina e (-)-epigallocatequina galato: terapias antioxidantes promissoras para o sêmen congelado caprino?.....</b>	<b>60</b>
<b>4.2 Efeito do resveratrol ou da quercetina sobre a congelação de espermatozoides caprinos.....</b>	<b>81</b>
<b>4.3 Uso de compostos fenólicos durante a separação e criopreservação de espermatozoides caprinos.....</b>	<b>101</b>
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>130</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A espécie caprina desempenha um importante papel socioeconômico em inúmeras regiões rurais desfavorecidas do mundo (CASTEL et al., 2010), a exemplo da região Nordeste do Brasil (CARVALHO e SOUZA, 2008). Por conseguinte, os caprinos apresentam-se disseminados por todo o mundo, o que se deve a sua alta adaptabilidade e capacidade produtora de alimentos (AZIZ, 2010), de alto valor nutricional (CASTEL et al., 2010). Assim, em virtude de sua capacidade produtora e da fácil adaptação aos sistemas intensivos de produção, o número de caprinos cresce em todo o planeta (ALEXANDER et al., 2010; AZIZ, 2010; CASTEL et al., 2010; ŽUJOVIĆ et al., 2011).

Diante do cenário de crescimento mundial da caprinocultura, são intensificados os programas de seleção; embora ainda muito restritos a países desenvolvidos (AZIZ, 2010). Desta forma, é nítida a necessidade e a importância da aplicação de técnicas de reprodução assistida aos rebanhos caprinos (CARNEIRO, 2007), as quais desempenham valoroso e crescente papel na produção e manejo desses animais (ALEXANDER et al., 2010). As técnicas de reprodução assistida auxiliam os programas de melhoramento animal e possibilitam o aumento do potencial reprodutivo e, conseqüentemente, produtivo dos rebanhos (NUNES, 2010).

Dentre as técnicas de reprodução assistida utilizadas na caprinocultura destaca-se a inseminação artificial (IA), em virtude de sua simplicidade, relativo baixo custo (BALDASSARRE e KARATZAS, 2004; NUNES, 2010) e capacidade de melhorar os manejos reprodutivo e produtivo das criações (LEBOEUF et al., 2000). Através da IA, o potencial reprodutivo dos machos é maximizado (NUNES, 2010; OLIVEIRA et al., 2013), especialmente quando associada ao uso do sêmen congelado (BALDASSARRE e KARATZAS, 2004). A congelação do sêmen permite o transporte e estocagem deste material indefinidamente, estendendo a vida útil do reprodutor e possibilitando o uso do sêmen independente da estação reprodutiva (BALDASSARRE e KARATZAS, 2004).

Além da criopreservação espermática, outra biotecnologia do sêmen que tem se destacado é a sexagem de espermatozoides. Por esta técnica o sexo da prole pode ser predeterminado e direcionado conforme a aptidão do rebanho (KLINC e RATH, 2006; HOSSEPIAN de LIMA, 2007). Deste modo, é maximizado o ganho genético, facilitado o manejo e aumentados os lucros da criação (OLIVEIRA et al., 2013).

Apesar das vantagens das biotecnologias do sêmen, especificamente da congelação e sexagem espermática, estas podem gerar injúrias aos espermatozoides, com comprometimento de sua funcionalidade (LEBOEUF et al., 2000; HOSSEPIAN de LIMA, 2007). Por conseguinte, a associação destas técnicas é dificultada em virtude da menor sobrevivência dos espermatozoides sexados após congelação e descongelação, o que se reflete na taxa de prenhez (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003).

Neste contexto, técnicas alternativas de sexagem têm sido aprimoradas ou desenvolvidas, a exemplo da centrifugação em gradientes de Percoll (HOSSEPIAN de LIMA et al., 2011; RESENDE et al., 2011), a fim de melhorar a qualidade do sêmen sexado e possibilitar sua congelação. Além disso, o uso de terapias antioxidantes tem sido vislumbrado como uma interessante ferramenta, na proteção dos espermatozoides, durante os processos de sexagem e/ou criopreservação espermática (KLINC e RATH, 2007; CHUNMEI et al., 2012; LI et al., 2012).

Com base no exposto, e no poder antioxidante dos compostos fenólicos (SARLÓS et al., 2002; BARREIROS et al., 2006; ADELA et al., 2010; SIMOS et al., 2012), foi objetivado neste estudo avaliar o efeito de diferentes concentrações de antioxidantes fenólicos sobre a congelabilidade de espermatozoides caprinos, bem como a ação destes durante a centrifugação em gradientes contínuos de densidade de Percoll e após congelação do sêmen selecionado.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Biotecnologias do sêmen

A utilização das biotecnologias da reprodução permite aumentar a eficiência reprodutiva e o progresso genético dos rebanhos caprinos, com consequente aumento da produtividade dos mesmos (NUNES, 2010). Assim sendo, as biotecnologias da reprodução desempenham um importante e crescente papel na produção e manejo desses animais (ALEXANDER et al., 2010), sendo utilizadas com a finalidade de maximizar a produção de animais de alta qualidade (RAHMAN et al., 2008).

Nesse contexto, as biotecnologias do sêmen, tais como a sexagem espermática e a congelamento, revolucionaram os programas de reprodução assistida em animais de produção (HOLT, 2000; HABERMANN et al., 2005), particularmente quando em associação com à IA (SALAMON e MAXWELL, 1995; PARRILLA et al., 2004). Pela utilização das biotecnologias do sêmen torna-se possível o uso e disseminação de material genético de alta qualidade, sem limites de tempo ou espaço (BALDASSARRE e KARATZAS, 2004), bem como o direcionamento do sexo da cria com base nas necessidades do rebanho (OLIVEIRA et al., 2013).

#### 2.1.1 Sexagem espermática

Segundo a literatura, a pré-determinação do sexo da progênie é uma biotécnica muito desejada pelo setor pecuário (MOHRI et al., 1986; ALMEIDA e ALVAREZ, 2003; SEIDEL Jr, 2003; WHEELER et al., 2006) e que contribui para o aumento da eficiência mundial na produção de alimentos (RAHMAN et al., 2008). Em mamíferos, diferentes rotas tecnológicas têm sido seguidas neste sentido (HOSSEPIAN de LIMA, 2007), como a determinação do sexo de embriões pré-implantação e a sexagem espermática (MURTA et al., 2013). Contudo, a técnica de sexagem espermática se sobressai em virtude de sua maior praticidade e da inexistência de limitações éticas (JOHNSON, 2000).

Por conseguinte, a sexagem de espermatozoides é uma biotécnica de grande importância econômica entre as espécies de interesse zootécnico (HABERMANN et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2013). O uso do sêmen sexado permite o direcionamento do rebanho, de acordo com sua aptidão produtiva (HABERMANN et al., 2005; KLINC e

RATH, 2006; HOSSEPIAN de LIMA, 2007), e a consequente maximização do ganho genético (HOSSEPIAN de LIMA, 2007; MURTA et al., 2013), produtividade e lucro da produção (HABERMANN et al., 2005; HOSSEPIAN de LIMA, 2007; OLIVEIRA et al., 2013).

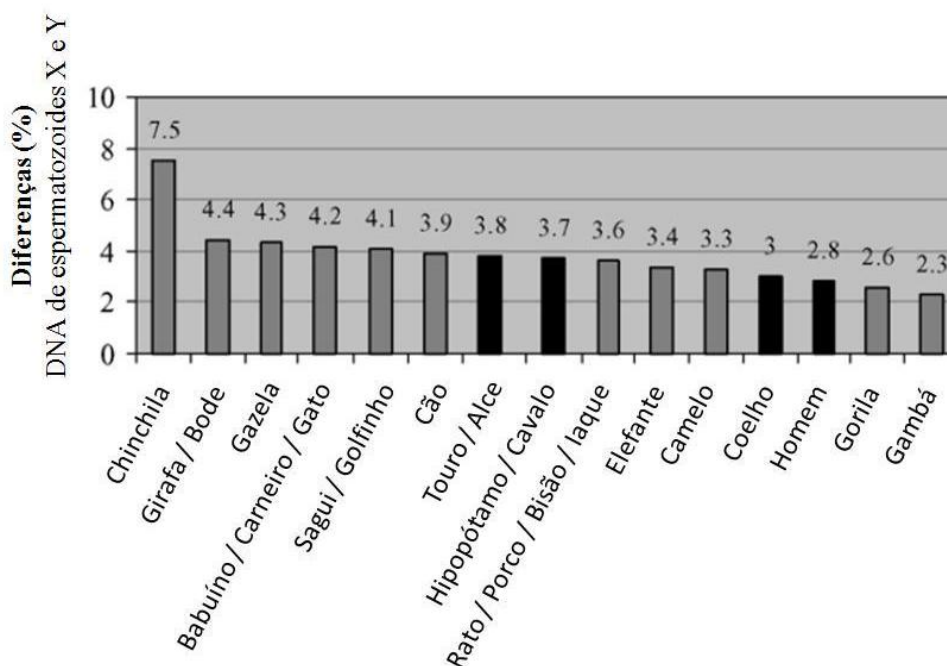
Com base no exposto, o uso do sêmen sexado, em associação a outras biotecnologias da reprodução (com destaque para a IA), tem sido proposto como uma forma de aumentar a eficiência produtiva de rebanhos caprinos em termos biológicos e econômicos (PARRILLA et al., 2004). Contudo, é importante ressaltar que a aplicação prática do sêmen sexado depende do custo benefício, resultados de fertilidade, eficiência e fácil uso deste material (JOHNSON, 2000; MAXWELL et al., 2004). Deste modo, os resultados obtidos com o uso de sêmen sexado só serão considerados satisfatórios caso a eficiência reprodutiva do rebanho não seja comprometida (OLIVEIRA et al., 2013).

O sexo dos mamíferos é determinado pelos cromossomos sexuais X e Y, presentes nos espermatozoides (GARNER, 2001). Assim, muitas técnicas de sexagem têm sido propostas com base nas diferenças químicas e físicas, existentes entre os espermatozoides portadores dos cromossomos X e Y (FLAHERTY e MATTHEWS, 1996; SILLS et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2013; MURTA et al., 2013). O parâmetro a ser utilizado como base para a separação espermática deve ter baixa variação biológica, uma vez que é determinante para a pureza e rendimento da amostra (VAN MUNSTER et al., 1999). Assim, muitas das metodologias desenvolvidas para a sexagem espermática têm resultados conflitantes e mostram-se incapazes de separar os espermatozoides X e Y (FLAHERTY e MATTHEWS, 1996).

Até o momento, a constituição cromossômica e, conseqüentemente, o conteúdo de DNA é a única diferença, estabelecida e validada cientificamente, em que podem ser baseados os métodos para separação eficiente de espermatozoides X e Y *in vitro* (OLIVEIRA et al., 2013). O conteúdo de DNA difere entre os cromossomos sexuais X e Y, em graus variáveis, de acordo com as espécies (Figura 1) (JOHNSON, 2000; GARNER, 2001). Com base nesta diferença foram desenvolvidos os métodos do citômetro de fluxo (modificado para este fim) e o da centrifugação em gradientes de densidade (HOSSEPIAN de LIMA, 2003; HOSSEPIAN de LIMA, 2007; OLIVEIRA et al., 2013).

Na espécie caprina, a diferença no conteúdo de DNA entre os espermatozoides X e Y é de 4,4%, o que permite a precisa identificação das duas populações e torna a técnica de sexagem atrativa para esses animais (PARRILLA et al., 2004). Em contrapartida, as

técnicas de sexagem espermática e o uso do sêmen sexado ainda precisam ser introduzidos na caprinocultura (ALEXANDER et al., 2010), havendo poucos relatos do uso da sexagem espermática nessa espécie (BATHGATE et al., 2013; SUREKA et al., 2013). Tal fato pode ser justificado pelo alto custo da técnica de sexagem comercialmente vigente (EVANS et al., 2004; MURTA et al., 2013), o que tem determinado a busca pelo desenvolvimento de metodologias alternativas a serem usadas em caprinos (SUREKA et al., 2013).



**Figura 1** - Diagrama com as diferenças no conteúdo de DNA entre os cromossomos sexuais X e Y em diferentes espécies.

Fonte: GARNER (2006); PARRILLA et al. (2004).

Para que a técnica de sexagem se torne comercial ela não deve danificar os espermatozoides e nem comprometer a fertilidade, deve permitir a congelamento do sêmen, ter acuidade de separação de espermatozoides X e Y próximo a 100% e determinar mínimas perdas espermáticas (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003; HABERMANN et al., 2005). Além disso, esta deve ser reproduzível, simples, rápida e de baixo custo para permitir sua difusão no mercado (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003). Em contrapartida, nenhum método de sexagem consegue reunir todas as condições necessárias para sua utilização prática e, por isso, muitas técnicas de sexagem foram abandonadas (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003).

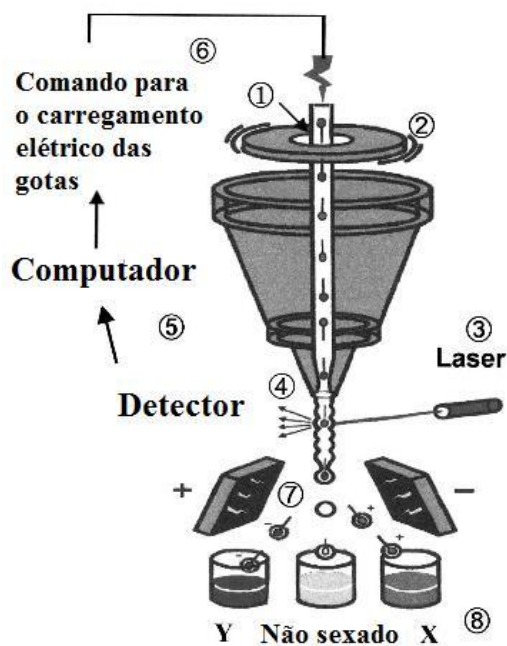


### *Sexagem de espermatozoides em citômetro de fluxo*

A sexagem em citômetro de fluxo é o método de separação física de espermatozoides que tem hoje o maior reconhecimento (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003). Essa metodologia se baseia na diferença entre o conteúdo de DNA de espermatozoides portadores dos cromossomos sexuais X e Y (FLAHERTY e MATTHEWS, 1996; SILLS et al., 1998; JOHNSON, 2000; SHARPE e EVANS, 2009), conforme anteriormente descrito (Figura 1). Assim sendo, quanto maior a diferença entre o conteúdo de DNA, mais eficientemente as subpopulações de espermatozoides X e Y são identificadas e separadas (MAXWELL et al., 2004).

Até o momento, a sexagem por citômetro de fluxo é a única metodologia que permite o real enriquecimento das amostras com espermatozoides X ou Y (FLAHERTY e MATTHEWS, 1996; JOHNSON, 2000; MURTA et al., 2013). Portanto, este é o único método completamente validado para a pré-seleção do sexo de mamíferos (JOHNSON, 2000), sendo considerado como de referência (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003) e por isso comercialmente disseminado. Pela citometria de fluxo, a separação de espermatozoides X e Y atinge pureza maior do que 85% (JOHNSON, 2000; GARNER, 2001; MAXWELL et al., 2004).

A técnica de sexagem por citometria baseia-se na coloração diferencial dos espermatozoides, emissão de raios laser e forças hidrodinâmicas que direcionam os gametas durante a separação (MURTA et al., 2013). Assim, após excitação pelo laser ultravioleta (UV), os espermatozoides corados com fluorocromo específico para DNA (Hoechst 33342) têm a quantidade de DNA mensurada (SHARPE e EVANS, 2009). Como a quantidade de DNA difere entre as subpopulações X e Y (JOHNSON, 2000; GARNER, 2001), a intensidade de fluorescência também é diferenciada, o que permite a identificação e separação dos gametas por esta técnica (Figura 2).



**Figura 2** - Diagrama esquemático do processo de sexagem de espermatozoides em citômetro de fluxo. 1) bombeamento dos espermatozoides através do sistema após ter sido corado com fluorocromo específico para DNA 2) vibração do cristal piezoelétrico para a formação de microgotas; 3) emissão de luz UV sobre os espermatozoides; 4) espermatozoides X emitem mais fluorescência do que os Y; 5) detecção da fluorescência e classificação dos espermatozoides como X, Y ou duvidosos; 6) aplicação de carga positiva, negativa ou nenhuma carga às microgotas; 7) desvio das microgotas carregadas ao passarem pelo campo elétrico gerado por placas; 8) coleta dos espermatozoides em diferentes recipientes de acordo com sua classificação (X, Y ou duvidosos/não espermatozoides).

Fonte: GARNER (2001).

Em contrapartida, a sexagem em citômetro de fluxo é uma metodologia de alto custo, sofisticada (EVANS et al., 2004; MURTA et al., 2013) e sem portabilidade, necessitando de equipamento caro e mão de obra qualificada para ser realizada (EVANS et al., 2004). Além disso, este é um processo lento (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003; MAXWELL et al., 2004; WHEELER et al., 2006), permitindo a separação de apenas  $6 \times 10^6$  espermatozoides de cada subpopulação (X e Y) por hora ou  $18 \times 10^6$  espermatozoides X por hora (JOHNSON, 2000; ALMEIDA e ALVAREZ, 2003). Desse modo, em termos

de custo-benefício, a dose inseminante com sêmen sexado contém baixa concentração espermática (cerca de 2,5 milhões de espermatozoides) (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003; EVANS et al., 2004).

Adicionalmente, o processo de sexagem em citômetro pode causar danos irreversíveis aos espermatozoides e ao seu DNA, com conseqüente comprometimento da fertilidade e da produção de embriões viáveis (MAXWELL et al., 2004; DeJARNETTE et al., 2011; MURTA et al., 2013). Isso porque, apesar das células danificadas serem eliminadas durante o processo de sexagem, as que sobrevivem têm menor tempo de vida (MAXWELL et al., 2004; GARNER, 2006). Nesse contexto, a associação entre as técnicas de sexagem e de congelação do sêmen é dificultada (MURTA et al., 2013), uma vez que durante a congelação os danos gerados pelo processo de sexagem são potencializados (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003).

As possíveis causas de injúrias aos espermatozoides submetidos à sexagem em citômetro de fluxo parecem estar associadas ao uso de corantes, alta diluição, incubação por longo período, submissão dos espermatozoides a alta pressão, exposição ao laser UV e centrifugação do sêmen pós-sexado (JOHNSON, 2000; EVANS et al., 2004; MAXWELL et al., 2004; GARNER, 2006). As altas taxas de diluição são responsáveis por induzir processo semelhante à capacitação, enquanto que a alta pressão utilizada compromete a cinética espermática (EVANS et al., 2004).

Com base no anteriormente exposto, a espécie bovina é a única em que a sexagem por citômetro de fluxo é usada comercialmente (MAXWELL et al., 2004). Nas demais espécies de interesse zootécnico há demanda pelo sêmen sexado, mas o alto custo em relação ao valor desses animais, limita a adoção dessa biotecnologia (EVANS et al., 2004). Assim, apesar da técnica de sexagem ser atrativa para a espécie caprina (PARRILLA et al., 2004), existe apenas um relato com o uso do citômetro de fluxo para a sexagem de espermatozoides desses animais (BATHGATE et al., 2013).

BATHGATE et al. (2013) relatam que a acuidade de separação entre as subpopulações de espermatozoides caprinos X e Y foi superior a 90%, bem como que estes gametas resistiram aos processos de sexagem e congelação, com obtenção de resultado positivo, embora preliminar, após IA. Em contrapartida, vale ressaltar que a qualidade do sêmen sexado e congelado, obtido neste estudo, foi baixa, tendo sido as médias mais altas de motilidade e viabilidade espermática de 28,83% e 41,00%, respectivamente. Além disso, a fertilidade após IA com espermatozoides X foi comprometida, tendo sido gerado

apenas um produto (embora do sexo desejado) das oito inseminações realizadas, enquanto que com o sêmen não sexado foram gerados 4 produtos das seis inseminações, dos quais 3 foram do sexo feminino.

#### *Sexagem de espermatozoides por centrifugação em gradientes de densidade de Percoll*

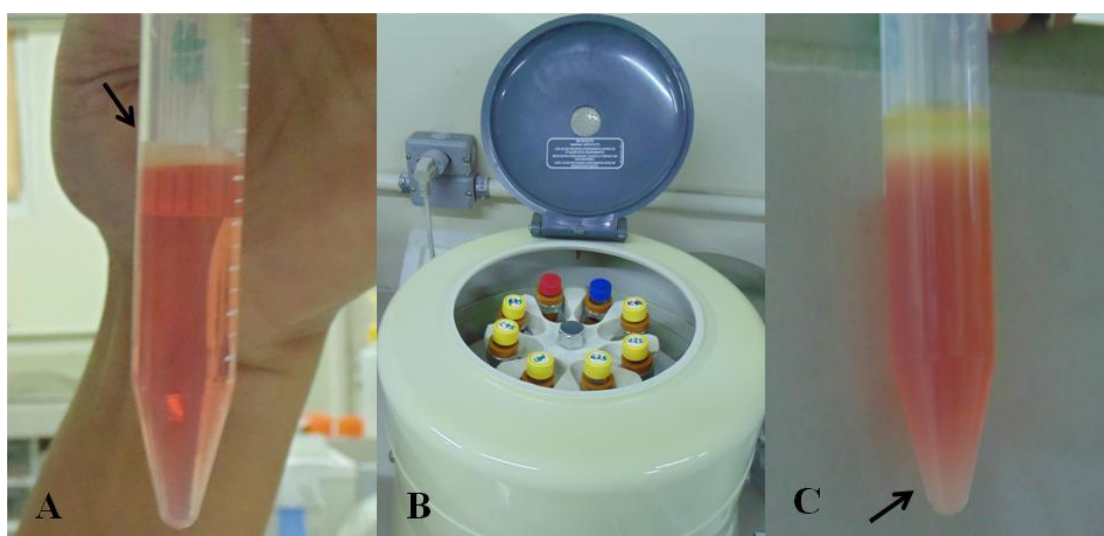
Embora a sexagem em citômetro de fluxo possibilite a separação dos espermatozoides X e Y com quase 100% de pureza (JOHNSON, 2000), o método é laborioso e caro (ANDERSEN e BYSKOV, 1997; HOSSEPIAN de LIMA, 2007). Além disso, é prejudicial aos espermatozoides (SEIDEL Jr e GARNER, 2002; EVANS et al., 2004) e não atende a demanda do mercado (HOSSEPIAN de LIMA, 2007). Deste modo, métodos alternativos mais simples (ANDERSEN e BYSKOV, 1997; RESENDE et al., 2009), de baixo custo (KANESHARATMAM et al., 2012), menos nocivos aos espermatozoides (EVANS et al., 2004) e que permitam a congelamento dos gametas, sem redução da fertilidade (HOSSEPIAN de LIMA, 2007; HOSSEPIAN de LIMA et al., 2011), têm sido buscados.

Dentre as metodologias alternativas, a centrifugação de espermatozoides através de meios de densidade crescente (gradientes), tais como os de Percoll, permitem a separação dos espermatozoides portadores de cromossomos sexuais X e Y (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003; HOSSEPIAN de LIMA, 2003). O Percoll é constituído de partículas de sílica coloidal (15-30 nm de diâmetro), coberta com polivinilpirrolidona (PVP) (CHEN e BONGSO, 1999; SAMARDŽIJA et al., 2006) e é utilizado para a preparação de soluções isotônicas com diferentes densidades (RESENDE et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011a; LUCIO et al., 2012). Tais soluções, quando depositadas em tubos de poliestirene, da maior para a menor densidade, formam o gradiente de densidade (RESENDE et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011a; LUCIO et al., 2012).

Os gradientes de densidade de Percoll podem ser descontínuos (HOSSEPIAN de LIMA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011a; LUCIO et al., 2012) ou contínuos (RESENDE et al., 2009; RESENDE et al., 2010; RESENDE et al., 2011). No caso do gradiente descontínuo, este é formado por camadas com densidades predeterminadas e evidentes, enquanto que no gradiente contínuo há aumento gradual e suave da densidade da porção superior à inferior (HANDBOOKS, 2001). O gradiente contínuo é formado a partir do descontínuo, o que é possível pela estocagem desse último a 4 °C durante 24 horas

(RESENDE et al., 2009; RESENDE et al., 2010). Pelo fato do gradiente contínuo pode ser estocado, o uso da metodologia de centrifugação em gradientes de densidade é facilitado (RESENDE et al., 2011).

Para efeito da sexagem, em gradiente descontínuo ou contínuo, o sêmen é depositado sobre o gradiente e submetido à centrifugação em rotor horizontal (HOSSEPIAN de LIMA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011a; RESENDE et al., 2011; LUCIO et al., 2012). Após centrifugação, os espermatozoides portadores do cromossomo X tendem a se depositar no fundo do gradiente (Figura 3), enquanto que os portadores do cromossomo Y ficam dispersos ao longo deste (HOSSEPIAN de LIMA et al., 2011). Tal fato é possível em virtude dos espermatozoides X possuírem mais DNA e nucleoproteínas do que os Y, ou seja, maior densidade (HOSSEPIAN de LIMA, 2007; HOSSEPIAN de LIMA et al., 2011), sendo o DNA responsável por 18% da massa da célula (HOSSEPIAN de LIMA, 2007).



**Figura 3** - Diagrama esquemático do processo de centrifugação de espermatozoides em gradiente contínuo de densidade de Percoll. A) gradiente contínuo de Percoll acrescido de sêmen; B) centrifugação em rotor horizontal; C) formação do pellet de espermatozoides no fundo do gradiente.

Fonte: SILVA (2013).

Além de realizar a seleção com base nos cromossomos sexuais (HOSSEPIAN de LIMA et al., 2000; HOSSEPIAN de LIMA, 2003), o gradiente de Percoll também é capaz de selecionar os espermatozoides em termos de viabilidade (SAMARDŽIJA et al., 2006;

OLIVEIRA et al., 2011a; OLIVEIRA et al., 2012). Nesse contexto, na fração mais densa do gradiente são retidos os espermatozoides de melhor qualidade e com desvio para o cromossomo X, enquanto que na parte superior são retidas as impurezas, tais como espermatozoides imaturos, anormais e imóveis. Portanto, é provável que a taxa de recuperação espermática, obtida após centrifugação em gradiente de Percoll, sofra influência da qualidade da amostra de sêmen inicial. Assim, quanto mais danificado o material, maior será a retenção de células nas camadas superiores do gradiente (OLIVEIRA et al., 2011a).

Resultados satisfatórios com a centrifugação em gradiente de densidade foram obtidos por HOSSEPIAN de LIMA et al. (2000) e HOSSEPIAN de LIMA et al. (2011) para a sexagem de espermatozoides bovinos em gradiente descontínuo de Percoll. Estes autores obtiveram acuidade de separação em torno de 75%, com repetibilidade de 70% e taxa de recuperação espermática de 25% na fração inferior do gradiente. Em contrapartida, os resultados obtidos com a sexagem por esta técnica ainda são muito variados, sendo observada, em sua maioria, baixa acuidade de separação entre os espermatozoides X e Y (WANG et al., 1994; ANDERSEN e BYSKOV, 1997; LIN et al., 1998; HENDRIKSEN, 1999; KOBAYASHI et al., 2004; RESENDE et al., 2011; LÚCIO et al., 2012).

Por conseguinte, embora os gradientes de densidade de Percoll possam ser utilizados para a pré-seleção do sexo feminino, em geral, isso é feito de forma discreta e insuficiente para influenciar, significativamente, a taxa do sexo ao nascimento (FLAHERTY e MATTHEWS, 1996). Deste modo, esta técnica deve ser melhorada em termos de acuidade, bem como de recuperação espermática; a qual é relativamente baixa (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003). A partir disso, a utilização deste método poderá tornar-se viável comercialmente, nos mais variados setores da produção animal (HOSSEPIAN de LIMA et al., 2011), que não apenas à bovinocultura.

A busca pelo aprimoramento da metodologia de centrifugação em gradiente de Percoll é justificável, com base em seu potencial para a seleção do sexo e relativo baixo custo (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003; KOBAYASHI et al., 2004). Associado a isso, a passagem através do gradiente de Percoll melhora a cinética e a viabilidade dos espermatozoides, em relação às amostras originais, bem como o percentual de espermatozoides normais (CHEN e BONGSO, 1999; OLIVEIRA et al., 2012; SAMARDŽIJA et al., 2006). Além disso, apesar da menor acuidade e taxa de recuperação, a produtividade obtida com os gradientes é superior à do citômetro de fluxo (HOSSEPIAN

de LIMA et al., 2011) e o uso do sêmen resultante não compromete a taxa de clivagem e de blastocistos formados (RESENDE et al., 2009).

Por outro lado, embora em menores proporções, a centrifugação em gradientes também pode gerar danos aos espermatozoides, diminuindo a resistência destes ao processo de congelação (HOSSEPIAN de LIMA, 2007). Contudo, nessa técnica os danos espermáticos são mais restritas ao acrossoma, o que foi correlacionado ao uso do sêmen congelado-descongelado durante o procedimento (OLIVEIRA et al., 2012). Deste modo, o uso de gradientes de densidade é ainda vantajoso em relação à citometria, visto que não apenas a acuidade de separação deve ser considerada, mas também a viabilidade dos espermatozoides sexados (HOSSEPIAN de LIMA, 2007). Além disso, é importante ressaltar que, para condições heterogêneas como as do Brasil, talvez seja mais viável optar-se por uma metodologia de baixo custo e com acuidade em torno de 75%, mas que permita obter índices de fertilidade satisfatórios, nas mais variadas condições de manejo (HOSSEPIAN de LIMA, 2007).

Além das alterações de acrossoma (OLIVEIRA et al., 2012), é importante ressaltar, que a centrifugação em gradiente de Percoll induz a capacitação espermática (MATÁS et al., 2011), fato este que compromete a resistência dos espermatozoides ao processo de congelação (HOSSEPIAN de LIMA, 2007). Por conseguinte, é necessária a realização de pesquisas a fim de aprimorar o método de centrifugação em gradiente de densidade de Percoll, de modo a incorporar estratégias que previnam a geração de danos aos espermatozoides durante o transporte, processamento e congelação desses (OLIVEIRA et al., 2011a). Tal necessidade se deve ao fato da congelação de sêmen em associação à técnica de sexagem espermática ser de grande importância comercial, uma vez que permite a ampla utilização do sêmen sexado (JOHNSON, 2000).

### 2.1.2 Congelação de sêmen

O frio é o promotor mais eficiente do estado de anabiose e sua ação na preservação de espermatozoides foi primeiramente evidenciada pelo veterinário russo IVANOV (MIES FILHO, 1982). No entanto, apenas a partir da descoberta do glicerol como agente crioprotetor, em 1949, as pesquisas com congelação de sêmen foram impulsionadas (MORAES et al., 1998; PESCH e BERGMANN, 2006). Por meio do aprimoramento da técnica de congelação, pelo uso do glicerol, tornou-se possível o armazenamento do sêmen

por tempo indeterminado e a utilização dos espermatozoides para a IA com sucesso (HOLT, 2000).

A congelação do sêmen é de grande importância para o avanço na produção de caprinos, uma vez que possibilita o melhoramento genético e o aumento da produtividade dos rebanhos, quando em associação a outras práticas de manejo (NUNES, 2010). Pelo uso dessa biotécnica, o sêmen de animais de alto valor zootécnico pode ser estocado indefinidamente, utilizado largamente e comercializado com facilidade, independente da estação reprodutiva (BALDASSARRE e KARATZAS, 2004; RAHMAN et al., 2008). Desse modo, a incorporação desta técnica à indústria do sêmen sexado oferece grandes vantagens comerciais (JOHNSON, 2000).

A criopreservação espermática é um processo complexo e que depende do equilíbrio de muitos fatores para obtenção de sucesso, sendo ainda influenciada pelas diferenças espécie-específicas (PURDY, 2006). A célula espermática sofre variações entre as espécies, com destaque para os níveis de colesterol e de saturação em suas membranas, o que determina a susceptibilidade destes gametas ao choque térmico (NUNES, 2010; OLIVEIRA, et al., 2013). Por conseguinte, protocolos de criopreservação otimizados para espermatozoides de uma espécie podem não ser compatíveis com os de outra (RAHMAN et al., 2008).

Com relação à espécie caprina, o processo de criopreservação espermática consiste em um desafio (PURDY, 2006). Tal fato se deve, especialmente, a presença da enzima fosfolipase A no plasma seminal dos reprodutores dessa espécie, a qual é secretada pelas glândulas bulbouretrais e interage com os fosfolipídios presentes nos diluidores seminais a base de leite ou gema de ovo (OLIVEIRA et al., 2013). A partir dessa interação são formadas substâncias tóxicas aos espermatozoides, de modo que para a criopreservação dos espermatozoides caprinos nesses meios é necessária a remoção do plasma seminal, por centrifugação, antes da diluição do sêmen (NUNES, 2010; OLIVEIRA et al., 2013). Contudo, o processo de centrifugação pode danificar os espermatozoides e aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (AGARWALL et al., 2005).

Apesar da necessidade de remover o plasma seminal na espécie caprina, o processo de congelação segue princípios básicos, comuns para todas as espécies trabalhadas. Para a congelação do sêmen, este deve ser diluído em meio apropriado, que ofereça ambiente favorável à manutenção e conservação dos espermatozoides (MIES FILHO, 1982). Deste modo, o diluidor seminal deve ter papel tamponante, nutricional (MIES FILHO, 1982;



PURDY, 2006) e protetor contra as crioinjúrias (SALAMON e MAXWELL, 2000; PURDY, 2006). Neste contexto, devem estar presentes no diluidor carboidratos como fonte de energia, crioprotetores não penetrantes para a nutrição e proteção dos espermatozoides durante a refrigeração, crioprotetores penetrantes para proteger os espermatozoides durante a congelação, tampões para evitar variações bruscas de pH e osmolaridade, e antibióticos (HAFEZ e HAFEZ, 2004; PURDY, 2006).

Os diluidores comumente utilizados para a congelação de espermatozoides caprinos são à base de leite ou de gema, que consistem em crioprotetores não penetrantes (PURDY, 2006). Estudos vêm sendo realizados a fim de estabelecer formulações livres de produtos de origem animal, o que beneficiará o comércio internacional de sêmen, em virtude da superação dos entraves sanitários. Dentro desse contexto, um diluidor à base de água de coco (ACP-101<sup>®</sup>) foi desenvolvido e já se encontra no mercado, podendo ser utilizado para a criopreservação de espermatozoides caprinos (OLIVEIRA, et al., 2011b). Além desse, outros diluidores têm sido formulados para a espécie caprina, a exemplo do que utiliza lecitina de soja como base (VIDAL et al., 2013).

Para a congelação, é indispensável que o meio diluidor seja adicionado de um crioprotetor penetrante, sendo o glicerol universalmente usado (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Os crioprotetores penetrantes caracterizam-se por sua permeabilidade às membranas, agindo intra e extracelularmente, e têm por finalidade preservar a sobrevivência e a fertilidade dos gametas durante a congelação (PURDY, 2006). O efeito protetor desses agentes resulta de suas propriedades coligativas, o que determina a redução do ponto eutético, desidratação celular e conseqüente menor formação de gelo intracelular (ÁVILA-PORTILLO et al., 2006). Contudo, os crioprotetores penetrantes podem apresentar efeito tóxico sobre os espermatozoides, devendo ser utilizados com cautela (SALAMON e MAXWELL, 2000; WATSON, 2000; ALVARENGA et al., 2005).

Após o processamento e diluição do sêmen, este é submetido às curvas de refrigeração e congelação, que devem ser realizadas gradualmente, a fim de evitar a geração de danos aos espermatozoides (MIES FILHO, 1982). Curvas rápidas de refrigeração são responsáveis por lesões celulares decorrentes de alterações nas propriedades físicas das membranas celulares (OLIVEIRA et al., 2013), o que se deve ao choque frio e formação de cristais de gelo (PESCH e BERGMAN, 2006). Apesar disso, taxas lentas de refrigeração também apresentam efeito negativo, uma vez que submetem os espermatozoides ao efeito solução, o qual se caracteriza pelo aumento da concentração de

solutos (PESCH e BERGMAN, 2006). Assim, uma taxa de refrigeração ideal deve evitar o desencadeamento desses dois efeitos (HOLT, 2000).

O processo de descongelação do sêmen, durante o qual ocorre o restabelecimento da água intracelular e do volume celular (HOLT et al., 1992), é descrito como responsável por danos aos espermatozoides. Ao longo da descongelação a célula apresenta alto consumo de oxigênio, fato que resulta na maior produção de ROS e em consequentes danos oxidativos (GUERRA et al., 2004). Assim, pode-se constatar que o processo de criopreservação, como um todo, representa evento atípico e estressante aos espermatozoides (STORNELLI et al., 2005).

Portanto, apesar de sua importância para a indústria da produção animal (SALAMON e MAXWELL, 1995; BALDASSARRE e KARATZAS, 2004), a criopreservação ocasiona danos espermáticos a níveis ultraestruturais, bioquímicos e funcionais (SALAMON e MAXWELL, 1995; LEBOEUF et al., 2000; PESCH e BERGMAN, 2006). Dentre estes, podem ser destacados os danos às membranas plasmática (ARRUDA et al., 2007) e mitocondrial (CÂMARA e GUERRA, 2008), danos ao acrossoma, peroxidação lipídica (AGARWALL et al., 2005; YENI et al., 2010), indução da capacitação (MORTIMER e MAXWELL, 2004) e da apoptose (FERRUSOLA et al., 2010) e a redução da motilidade (WATSON, 2000). Conseqüentemente, o processo de congelamento pode ser relacionado ao comprometimento da fertilidade dos espermatozoides (STORNELLI et al., 2005) e dos resultados após IA (LEBOEUF et al., 2000).

## **2.2 Espécies reativas de oxigênio (ROS) e danos oxidativos**

As ROS correspondem às várias formas de oxigênio ativado (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004) e são produzidas nos sistemas biológicos a partir do metabolismo do oxigênio (FERREIRA e MATSUBARA, 1997), em um sistema de redução em cadeia (BLAKE et al., 1987). Dentre as ROS com importância na reprodução destacam-se o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) (MANEESH e JAYALEKSHMI, 2006). O  $O_2^{\cdot-}$ , embora seja um radical livre, possui limitada reatividade em virtude de sua baixa permeabilidade à membranas celulares (ALVAREZ e MORAES, 2006), baixa solubilidade e curta meia vida (BLAKE et al., 1987).

Por outro lado, o  $H_2O_2$  possui longa vida e alta permeabilidade às membranas (BLAKE et al., 1987), o que o torna altamente nocivo aos sistemas biológicos (BAUMBER et al., 2000; ALVAREZ e MORAES, 2006), mesmo sem ser um radical livre. Com relação ao  $OH^\bullet$ , apesar de sua curta meia vida, este é um radical livre extremamente reativo que altera as moléculas localizadas em seu sítio de formação (BLAKE et al., 1987). Assim, este é considerado a ROS mais nociva aos sistemas biológicos, sendo responsável por danos ao DNA, RNA, proteínas e lipídios (BARREIROS et al., 2006).

Além das ROS existem também as espécies reativas de nitrogênio (RNS), as quais derivam do metabolismo do nitrogênio (TURRENS, 2003), mas que genericamente são chamadas também como ROS. Entre as principais RNS podem ser destacados o óxido nítrico ( $ON^\bullet$ ) e o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (VASCONCELOS et al., 2007). No caso do  $ON^\bullet$ , sua ação deletéria vai depender de sua concentração e da interação com o  $H_2O_2$  (MANEESH e JAYALEKSHMI, 2006), podendo, assim, determinar efeito citotóxico e citostático sobre os espermatozoides (CARVALHO et al., 2002). Por outro lado, o  $ONOO^-$  é um potente oxidante, altamente instável e com curta meia vida, assemelhando-se ao  $OH^\bullet$  (VASCONCELOS et al., 2007).

As ROS têm importante papel em inúmeros processos biológicos e são geradas em células aeróbias, especialmente, pela cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria (EFRAIM et al., 2011). Portanto, a maior produção de ROS ocorre dentro dos espermatozoides (endógena) e não fora deles (exógena) (MAIA e BICUDO, 2009). Os espermatozoides estão sobre constante influência das ROS (AGARWAL et al., 2005), o que é fundamental para que haja a capacitação e a reação acrossomal (De LAMIRANDE, 1997; MAIA e BICUDO, 2009); processos que fisiologicamente devem ocorrer no trato reprodutivo da fêmea (GADELLA, 2008).

Apesar de seu papel fundamental para a fisiologia dos espermatozoides (De LAMIRANDE, 1997), o excesso de ROS, oriundo do desequilíbrio entre os sistemas de produção e remoção destes agentes, resulta no estresse oxidativo (RANAWAT et al., 2013) e em consequente disfunção espermática (ZINI e LIBMAN, 2006; MARCHESI e FENG, 2007). Isso acontece porque as ROS têm como substratos moleculares mais frequentes os lipídios, as proteínas, os carboidratos e o DNA (ORTEGA et al., 2003), fato que torna as células altamente susceptíveis aos danos oxidativos (SANOCKA e KURPISZ, 2004). Dentre os danos oxidativos aos espermatozoides destaca-se a lipoperoxidação, que consiste em uma reação de auto-oxidação responsável pela deterioração dos lipídios poli-

insaturados (SAIGG e SILVA, 2009); visto que os espermatozoides são ricos em ácidos graxos insaturados (SIKKA, 2004; BANSAL e BILASPURI, 2011).

Durante a manipulação do sêmen, o estresse oxidativo é exacerbado (MAZZI et al., 2011). Assim, a maior razão para a redução da sobrevivência espermática, durante a sexagem (KLINC e RATH, 2007) e a congelação do sêmen (MAIA e BICUDO, 2009; BANSAL e BILASPURI, 2011), tem sido atribuída ao aumento na produção de ROS e aos consequentes danos oxidativos gerados. Os processos de centrifugação e criopreservação favorecem o desequilíbrio entre os sistemas produtores e removedores (sistemas de defesa antioxidante) de ROS (SALEH e AGARWAL, 2002; GUERRA et al., 2004).

Dentre os danos espermáticos desencadeados pelas ROS, durante os processos de sexagem e congelação (crioinjúrias), destacam-se os que ocorrem ao nível de membrana plasmática, os quais são oriundos, sobretudo, da lipoperoxidação (MACHADO et al., 2008). Além disso, a ação das ROS é responsável pelo comprometimento da motilidade (AITKEN et al., 2007) e da atividade mitocondrial dos espermatozoides (JONES e MANN, 1977), bem como pela indução da capacitação e reação acrossomal (BREITBART e NAOR, 1999). Assim, por meio da ação deletéria das ROS, a função e viabilidade espermática são comprometidas (De LAMIRANDE, 1997) e, conseqüentemente, a fertilidade dos gametas (BAKER e AITKEN, 2005; RANAWAT et al., 2013).

### **2.3 Terapias antioxidantes**

Antioxidantes são compostos que podem retardar ou inibir a oxidação de moléculas biológicas, evitando o início ou a propagação das reações em cadeia de oxidação (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004). Os antioxidantes podem ser enzimáticos ou não enzimáticos (SILVA e GUERRA, 2012), dentre os quais têm se destacado os compostos fenólicos, em virtude do seu potencial protetor (SARLÓS et al., 2002; BARREIROS et al., 2006; SIMOS et al., 2012). Nesse contexto, terapias antioxidantes são realizadas, durante a sexagem e/ou criopreservação espermática, a fim de minimizar os danos oxidativos gerados (KLINC e RATH, 2007; CHUNMEI et al., 2012; LI et al., 2012).

Resultados satisfatórios foram obtidos com o uso de catalase (KLINC e RATH, 2007), ácido ascórbico (CHUNMEI et al., 2012) e melatonina (LI et al., 2012) sobre espermatozoides das espécies bovina, suína e bubalina, respectivamente, durante a sexagem em citometria e criopreservação do sêmen. Apesar disso, os estudos com o uso de

antioxidantes na sexagem espermática têm sido restritos e privilegiam a técnica de citômetro de fluxo. Contudo, o aprimoramento da metodologia de centrifugação em gradientes de densidade de Percoll também é necessário (OLIVEIRA et al., 2011a), podendo os antioxidantes atuar como importante ferramenta, em virtude de seu efeito protetor sobre os espermatozoides (AGARWAL et al., 2005).

### 2.3.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário das plantas (MACHADO et al., 2008; EFRAIM et al., 2011) e, portanto, encontram-se amplamente distribuídos nessas, sendo as frutas, legumes e seus derivados (vinhos e chás, por exemplo) as principais fontes de compostos fenólicos (VACCARI et al., 2009; LI, 2011). Em termos de estrutura química, os compostos fenólicos se caracterizam pela presença de um ou mais grupos hidroxila (-OH) ligados ao anel aromático, o que permite classificá-los como mono, bi ou polifenóis (LI, 2011). No caso dos polifenóis, estes são classificados como flavonoides e não flavonoides, sendo os primeiros derivados da estrutura química C6-C3-C6 e os segundos das estruturas químicas C6-C1, C6-C3 e C6-C2-C6 (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004).

Os polifenóis se destacam por seu alto potencial antioxidante agindo como sequestradores de ROS, quelantes de íons metálicos e inibidores da lipoperoxidação (SAIGG e SILVA, 2009). Neste contexto, atenção especial tem sido dedicada aos flavonoides quercetina (TORREGGIANI et al., 2005; GIBB et al., 2013) e catequinas (PURDY et al., 2004; SIMOS et al., 2012), assim como ao não flavonoide estilbeno trans-resveratrol (STOJANOVIĆ et al., 2001; SARLÓS et al., 2002) nas práticas da biotecnologia do sêmen. Resultados satisfatórios, embora contraditórios, têm sido obtidos com o uso desses agentes para a preservação dos espermatozoides submetidos à manipulação laboratorial, a exemplo das práticas de sexagem (GIBB et al., 2013) e criopreservação de sêmen (SARLÓS et al., 2002; PURDY et al., 2004, SILVA et al., 2012).

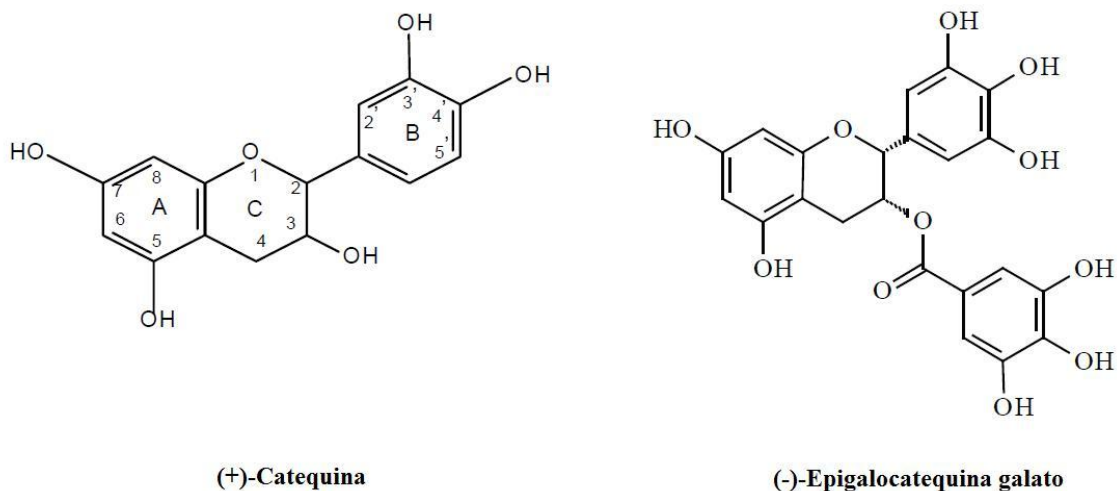
A variabilidade de resultados obtidos com o uso de compostos fenólicos se deve ao fato de suas propriedades biológicas dependerem não apenas das estruturas químicas, mas também do ambiente ao qual são expostos para execução de sua atividade antioxidante (MAMEDE e PASTORE 2004; MIRA et al., 2008). Assim, fatores como pH (ZHU et al.,

1997; CHOBOT et al., 2009), composição do meio (ARTS et al., 2002; HASSAN et al., 2013), irradiação e tensão de oxigênio (NATH et al., 2012) podem prejudicar a atividade antioxidante dos compostos fenólicos. Além disso, a dose utilizada do polifenol (LIMA et al., 2001; MORETTI et al., 2012) e o tipo celular trabalhado são fatores determinantes para o efeito final destes agentes, os quais podem ainda apresentar efeito pró-oxidante sobre determinadas circunstâncias (BIANCH e ANTUNES, 1999).

### *Catequinas*

As catequinas são flavonoides (KALENDER et al., 2002; LI, 2011) pertencentes ao grupo dos flavanóis, com base em sua estrutura química (MARTÍNEZ-FLOREZ et al., 2002). Estes polifenóis são largamente encontrados em alimentos vegetais e derivados (WILLIAMSON e MANACH, 2005; LI, 2011), com destaque para os chás e mais particularmente o chá verde (WEINREB et al., 2009; LI, 2011). Dentre as catequinas pode-se destacar a (+)-catequina, (+)-galocatequina, (-)-epicatequina, (-)-epigalocatequina, (-)-epicatequina galato e (-)-epigalocatequina galato (SENGER et al., 2010).

A (+)-catequina e, especialmente, a (-)-epigalocatequina galato (EGCG) estão entre os compostos fitoquímicos mais estudados atualmente (SENGER et al., 2010), o que se deve a sua atividade antioxidante (ADELA et al., 2010; CHACKO et al., 2010; SIMOS et al., 2012). As catequinas possuem estrutura química (Figura 4) privilegiada, de modo que o poder antioxidante dessas é maior do que o de outros agentes (ZAVERI, 2006; WEINREB et al., 2009). No caso da EGCG, além de ser a mais abundante catequina (WEINREB et al., 2009; LI, 2011), tem poder antioxidante superior até mesmo ao de outras catequinas (ADELA et al., 2010).



**Figura 4** - Estrutura química da (+)-catequina e (-)-epigallocatequina galato.

Fonte: MAMEDE e PASTORE (2004); SAITO et al. (2006).

O efeito protetor das catequinas pode estar relacionado à sua capacidade em doar elétrons (íons hidrogênio), ao efeito regulador sobre a expressão de enzimas antioxidantes (ROTAVA et al., 2009; SIMOS et al., 2012), proteção sobre outros antioxidantes (CRESPY e WILLIAMSON, 2004; CHACKO et al., 2010) e quelando íons metálicos (KALENDER et al., 2002; 2008; CHOBOT et al., 2009; SENGER et al., 2010). Além disso, as catequinas têm importante papel como inibidor enzimático, especialmente sobre as oxidases (LI, 2011).

Dentre as enzimas que sofrem inibição pela ação das catequinas estão a ciclooxigenase (COX) (KUNDU et al., 2003; MACHADO et al., 2008), lipoxigenase (LOX) (MACHADO et al., 2008; SENGER et al., 2010), fosfolipase A2 (PLA2) (WANG et al., 2006) e caspases (VALLORANI et al., 2010). Tais enzimas estão diretamente relacionadas ao desencadeamento dos processos de capacitação, reação acrossomal (ROLDAN, 1998; BREITBART e NAOR, 1999) e apoptose (WANG et al., 2003) nos espermatozoides. Eventos estes que podem ser induzidos, prematuramente, pelo processamento laboratorial do sêmen (WATSON, 2000; KLINC et al., 2007; MAZZI et al., 2011). A ação das catequinas também inibe a F0F1-ATPase, enzima responsável pela síntese de ATP nas mitocôndrias (ZHENG e RAMIREZ, 2000).

Com base no exposto, é evidenciado que as catequinas inibem enzimas que induzem o estresse oxidativo e, a partir disso, desempenham efeito protetor sobre as membranas e mitocôndrias e bloqueiam a apoptose (HEO e LEE, 2005). Efeitos benéficos

das catequinas têm sido obtidos tanto *in vitro* quanto *in vivo* (SAVI et al., 2006), dentre os quais estão a ação antibacteriana (MABE et al., 1999; SONG et al., 2005), antitumoral (SCHLACHTERMAN et al., 2008; GU et al., 2013) e antiobesidade (DULLOO et al., 1999; NAGAO et al., 2005). Além disso, as catequinas podem atuar como potentes neuroprotetores (WEINREB et al., 2009) e protetores espermáticos (PURDY et al., 2004; BOONSORN et al., 2010; VALLORANI et al., 2010).

Por outro lado, a manifestação dos efeitos benéficos das catequinas sofre a interferência de inúmeros fatores, dentre os quais o pH, a composição do meio (CHOBOT et al., 2009; HASSAN et al., 2013), a irradiação e a tensão de oxigênio (NATH et al., 2012; POOL et al., 2012). Com relação ao pH, as catequinas são estáveis em pH ácido ( $\text{pH} < 4$ ) e perdem sua estabilidade a medida que o pH aumenta, tornando-se instável em pH alcalino ( $\text{pH} > 8$ ) (ZHU et al., 1997; CHOBOT et al., 2009). Assim, sobre condições alcalinas, as catequinas são degradadas (ZHU et al., 1997; CHOBOT et al., 2009), com consequente comprometimento de sua atividade antioxidante e formação de o-quinonas (produtos de reação) instáveis (JANEIRO e BRETT, 2004). Além disso, nestas condições a carga do flavonoide é alterada (MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2002).

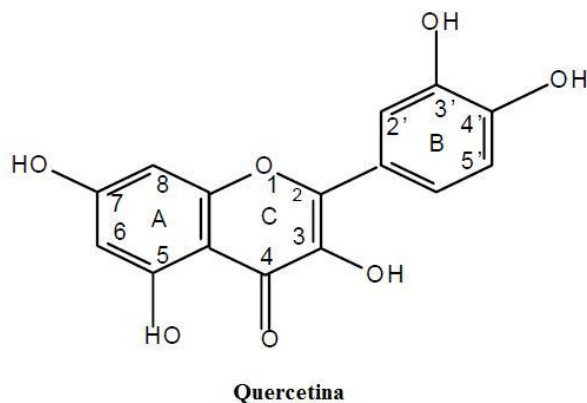
Portanto, em meio alcalino as catequinas passam a ser negativamente carregadas, o que faz com que sejam repelidas pela membrana da célula, a qual é carregada negativamente por natureza (MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2002). Além disso, meios ricos em proteínas podem ser prejudiciais à atividade desses flavonoides, o que se deve a alta afinidade que possuem em relação a proteínas como a caseína do leite, com as quais formam complexos estáveis (ARTS et al., 2002; HASSAN et al., 2013). Adicionalmente, as catequinas podem sofrer a ação da luz e do oxigênio, sendo assim oxidadas e tendo seu papel antioxidante comprometido (NATH et al., 2012; POOL et al., 2012).

### *Quercetina*

A quercetina é um flavonoide aglicona da subclasse dos flavonóis, largamente encontrada no reino vegetal, com destaque para as frutas, legumes e seus derivados (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004; KELLY, 2011). Em virtude da dupla ligação na posição 2,3, da função oxo ( $-\text{C}=\text{O}$ ) no anel C e da presença de grupos hidroxila nas posições 3 e 5 (Figura 5), a quercetina possui maior atividade antioxidante do que outros agentes, tais como as catequinas (MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2002; MAMEDE e



PASTORE, 2004). Assim, a quercetina é o flavonoide que melhor reúne os requisitos necessários para exercer efetiva ação antioxidante (MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2002).



**Figura 5** - Estrutura química do flavonoide quercetina.

Fonte: MAMEDE e PASTORE (2004).

A ação protetora da quercetina decorre de seu potencial em remover ROS, embora atue também como quelante de metais de transição (TORREGGIANI et al., 2005) e regulador/inibidor enzimático (SATORRE e CÓRDOBA, 2010). Dentre as enzimas inibidas por este agente destacam-se aquelas ligadas ao processo oxidativo, tais como a LOX (KELLY, 2011), COX, óxido nítrico sintase (MACHADO et al., 2008; KELLY, 2011) e proteína tirosina quinase (MACHADO et al., 2008). Todavia, a quercetina também inibe enzimas fundamentais a manutenção da função espermática, como a FOF1-ATPase (ZHENG e RAMIREZ, 2000) e a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (NASS-ARDEN e BREITBART, 1990; KHANDUJA et al., 2001), fato que torna o efeito deste polifenol sobre a reprodução ainda controverso (RANAWAT et al., 2013).

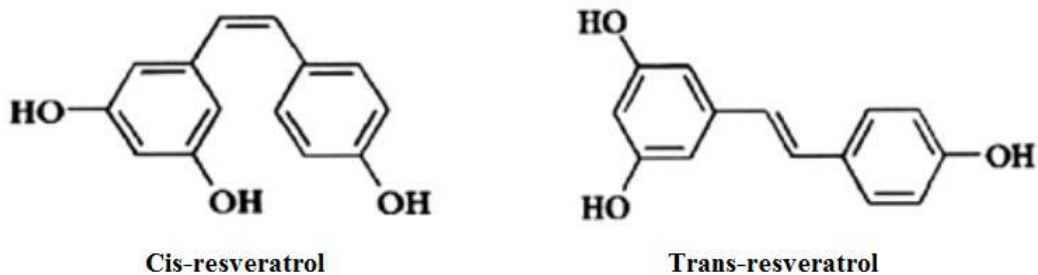
A quercetina é considerada um composto lipofílico (KELLY, 2011; CARRASCO-POZO et al., 2012) e nucleofílico (GIBB et al., 2013), o que a torna hábil em interagir (MORETTI et al., 2012) e atravessar membranas biológicas, possibilitando assim a proteção das células (KELLY, 2011; CARRASCO-POZO et al., 2012). Portanto, com base em suas propriedades benéficas, este flavonoide tem se destacado como uma promissora terapia na proteção celular, frente à peroxidação lipídica (NASS-ARDEN e BREITBART, 1990). Nesse contexto, o efeito protetor da quercetina já foi evidenciado sobre células espermáticas (MCNIVEN e RICHARDSON, 2003; KHAKI et al., 2010; ZRIBI et al.,

2012) e hepáticas (BAKHSHAESHI et al., 2012), além de agir como anti-hipertensivo (EDWARDS et al., 2007) e anticarcinogênico (WANG et al., 2011).

O uso da quercetina como uma terapia antioxidante durante a criopreservação de espermatozoides tem resultados muito variados (NASS-ARDEN e BREITBART, 1990; SILVA et al., 2012; GIBB et al., 2013). Tal fato pode ser justificado pelo efeito da quercetina ser dose dependente, podendo comprometer a qualidade do sêmen quando em altas concentrações (MORETTI et al., 2012), bem como por inibir a  $\text{Ca}^{+}$ -ATPase (NASS-ARDEN e BREITBART, 1990; WILLIAMS e FORD, 2003). Esta última é uma enzima envolvida no transporte de cálcio e, portanto, fundamental à manutenção dos níveis fisiológicos de cálcio intracelular e conseqüentemente da motilidade e fertilidade espermática (SIKDAR et al., 1993; WILLIAMS e FORD, 2003; SCHUH et al., 2004). Além disso, a quercetina pode reagir com o ferro e tornar-se um pró-oxidante (BIANCH e ANTUNES, 1999; KELLY, 2011).

### *Resveratrol*

O Resveratrol é um composto fenólico não flavonoide, pertencente à família dos estilbenos (VACCARI et al., 2009; MISHRA, 2011; PLANAS et al., 2011) e que pode ser encontrado nas formas cis (cis-3,5,4-trihidroxiestilbeno) e trans (trans-3,5,4-trihidroxiestilbeno) (Figura 6) (TRELA e WATERHOUSE, 1996; SAUTER et al., 2005). A produção de resveratrol ocorre quase exclusivamente (95%) nas cascas e sementes das uvas (VACCARI et al., 2009), em resposta a situações de estresse as quais a videira é exposta, sendo por isso o resveratrol classificado como uma fitoalexina (STERVBO et al., 2007; MISHRA, 2011). Por ser o resveratrol um metabólito secundário de plantas (MACHADO et al., 2008), suas fontes são os vegetais e seus derivados, particularmente, uvas e vinho tinto (CARRASCO-POZO et al., 2012).



**Figura 6** - Estrutura química dos isômeros cis (A) e trans-resveratrol (B).

Fonte: SAUTER et al. (2005).

Atenção especial tem sido dada ao trans-resveratrol em virtude de seu elevado potencial antioxidante (SARLÓS et al., 2002), o qual é superior ao das vitaminas C e E (STOJANOVIĆ et al., 2001). A atividade antioxidante dos polifenóis não-flavonoides está relacionada com a posição dos grupos hidroxila e também com a proximidade do grupo -CO<sub>2</sub>H com o grupo fenil (MAMEDE e PASTORE 2004). Nesse contexto, o trans-resveratrol tem demonstrado papel de destaque na proteção contra o envelhecimento (MISHRA, 2011), enfermidades como o câncer (STERVBO et al., 2006; LI e CHEN, 2011) e as doenças cardiovasculares (PETROVSKI et al., 2011), neurológicas e virais, bem como contra os processos inflamatórios (MISHRA, 2011).

Por outro lado, quando o resveratrol é utilizado como uma terapia antioxidante nas tecnologias do sêmen, os resultados obtidos são variáveis e inconclusivos (SILVA e GUERRA, 2012). Existem relatos sobre o efeito benéfico deste polifenol na preservação dos espermatozoides submetidos à criopreservação (SARLÓS et al., 2002; GARCEZ et al., 2010). Porém, a maior parte dos estudos demonstram que este agente é incapaz de manter ou melhorar a integridade estrutural e funcional dos espermatozoides, durante a criopreservação, podendo determinar efeito negativo sobre estes gametas quando usado em concentrações elevadas (SILVA et al., 2012; MARTIN-HIDALGO et al., 2013).

Os resultados inconstantes obtidos com o uso do resveratrol, durante o processamento do sêmen, podem ser decorrentes de seu papel como inibidor enzimático (KOWALSKA et al., 2011). Nesse contexto, este estilbeno é descrito como potente inibidor das enzimas F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase (ZHENG e RAMIREZ, 2000) e COX, mais especificamente da COX-1 (KENNEDY et al., 2003; KOWALSKA et al., 2011). Essas enzimas são responsáveis pela síntese de ATP mitocondrial (ZHENG e RAMIREZ, 2000) e de prostaglandinas (KENNEDY et al., 2003), respectivamente; fatores diretamente

relacionados ao deslocamento espermático (KENNEDY et al., 2003; MARTIN-HIDALGO et al., 2013).

### 3 REFERÊNCIAS

- ADELA, P.; DUMITRIȚA, R.; RALUCA, P., CARMEN, S. Catechin-rich green tea extract modulates the oxidative status of human retinal pigment epithelial cells. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 15, n. 1, p. 4964- 4978, 2010.
- 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.
- AITKEN, R.J.; WINGATE, J.K.; IULIIS, G.N.D.; McLAUGHLIN, E.A. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. **Molecular Human Reproduction**, v. 13, n. 4, p. 203-211, 2007.
- ALEXANDER, B.; MASTROMONACO, G.; KING, W.A. Recent advances in reproductive biotechnologies in sheep and goat. **Journal of Veterinary Science and Technology**, v.1, n. 1, p. 1-8, 2010.
- ALMEIDA, G.P.; ALVAREZ, R.H. Métodos de separação de espermatozoides para escolha do sexo dos animais domésticos. **Boletim de Indústria Animal**, v. 60, n. 1, p. 107-115, 2003.
- ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 105-113, 2005.
- 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.
- ANDERSEN, C.Y.; BYSKOV, A.G. Enhanced separation of X and Y bearing sperm cells by a combined density gradient centrifugation evaluated by fluorescence in situ hybridization of the Y-chromosome. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 76, n. 2, p. 131-134, 1997.
- ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; PERES, K.R.; RAPHAEL, C.F.; NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, E.C.C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 1, p. 8-16, 2007.
- ARTS, M.J.T.J.; HAENEN, G.R.M.M.; WILMS, L.C.; BEETSTRA, S.A.J.N.; HEIJNEN, C.G.M.; VOSS, H.-P.; BAST, A. Interactions between flavonoids and proteins: effect on the total antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 5, p. 1184-1187, 2002.

ÁVILA-PORTILLO, L.M.; MADERO, J.I.; LÓPEZ, C.; LEÓN, M.F.; ACOSTA, L.; GÓMEZ, C.; DELGADO, L.G.; GÓMEZ, C.; LOZANO, J.M.; REGUERO, M.T. Fundamentos de criopreservación. **Revista Colombiana de Obstetrícia u Ginecologia**, v. 57, n. 4, p. 291-300, 2006.

AZIZ, M.A. **Present status of the world goat populations and their productivity**. Lohmann Information, v. 45, n. 2, 2010. 43 p.

BAKER, M.A.; AITKEN, R.J. Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, p. 67-75, 2005.

BAKSHAESHI, M; KHAKI, A.; FATHIAZAD, F.; IMANI, S.A.M; KHAKI, A.A.; GHADAMKHEIR, E. Modulating effects of quercetin on aldehyde oxidase (OX-LDL) and hepatocytes injury in Streptozotocin-induced diabetic rat. **Journal of Cell and Animal Biology**, v. 6, n. 3, p. 41-45, 2012.

BALDASSARRE, H.; KARATZAS, C.N. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 255-266, 2004.

BANSAL, A.K.; BILASPURIG.S. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, p. 1-7, 2011.

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.

BATHGATE, R.; MACE, N.; HEASMAN, K.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C.; DE GRAAF, S.P. Birth of kids after artificial insemination with sex-sorted, frozen-thawed goat spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 48, p. 893-898, 2013.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M.C.G. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 6, p. 895-902, 2000.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta (Free radicals and the main dietary antioxidants). **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BLAKE, D.R.; ALLEN, R.E.; LUNEC, J. Free radicals in biological systems – a review orientated to inflammatory processes. **British Medical Bulletin**, v. 43, n. 2, p. 371-385, 1987.

BOONSORN, T.; KONGBUNTAD, W.; NARKKONG, N.-A.; AENGWANICH, W. Effects of catechin addition to extender on sperm quality and lipid peroxidation in boar semen. **American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 7, n. 3, p. 283-288, 2010.

BREITBART, H; NAOR, Z. Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. **Reviews of Reproduction**, v. 4, p. 151-159, 1999.

CÂMARA, D.R.; GUERRA, M.M.P. Mitocôndria espermática: além da síntese de adenosina trifosfato (ATP). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, p. 93-99, 2008.

CARNEIRO, G.F. Biotecnologia da reprodução na espécie caprina: perspectivas atuais. (Reproductive biotechnology in goat: current status). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 268-273, 2007.

CARRASCO-POZO, C.; MIZGIER, M.L.; SPEISKY, H.; GOTTELAND, M. Differential protective effects of quercetin, resveratrol, rutin and epigallocatechin gallate against mitochondrial dysfunction induced by indomethacin in Caco-2 cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 195, n. 3, p. 199-205, 2012.

CARVALHO, D.M.; SOUZA, J.P. Análise da cadeia produtiva da caprino-ovinocultura em Garanhuns. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, n. 46, 2008, Rio Branco. Anais...Rio Branco: SOBER, 2008, CDROOM.

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, n.1, p. 33-38, 2002.

CASTEL, J.M.; RUIZ, F.A.; MENA, Y.; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, M. Present situation and future perspectives for goat production systems in Spain. **Small Ruminant Research**, v. 89, p. 207-210, 2010.

CHACKO, S.M.; THAMBI, P.T.; KUTTAN, R.; NISHIGAKI, I. Beneficial effects of green tea: A literature review. **Chinese Medicine**, v. 5, p. 1-9, 2010.

CHEN, M.-J.; BONGSO, A. Comparative evaluation of two density gradient preparations for sperm separation for medically assisted conception. **Human Reproduction**, v.14, n. 3, p.759-764, 1999.

CHOBOT, V.; HUBER, C.; TRETTEHNAHN, G.; HADACEK, F. (±)-Catechin: Chemical weapon, antioxidant, or stress regulator?. **Journal of Chemical Ecology**. v. 35, p. 980-996, 2009.

CHUNMEI, X.; WEI, X.; SHENG, Y.; LEI, A., XIHE, L.; ZHONGHONG, W.; JIAXING, Z.; ZHUQING, W.; JIANHUI, T. Effect of antioxidant supplementation on function and fertility of sex-sorted boar spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 136, p. 108-114, 2012.

CRESPY, V.; WILLIAMSON, G. A Review of the Health Effects of Green Tea Catechins in *in vivo* animal models. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 12, p. 3431S-3440S, 2004.

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

DeJARNETTE, J. M.; LEACH, M. A.; NEBEL, R. L.; MARSHALL, C. E.; McCLEARY, C. R.; MORENO, J. F. Effects of sex-sorting and sperm dosage on conception rates of Holstein heifers: Is comparable fertility of sex-sorted and conventional semen plausible?. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 3477-3483, 2011.

De LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 48-54, 1997.

DULLOO, A.G.; DURET, C.; ROHRER, D.; GIRARDIER, L.; MENSI, N.; FATHI, M.; CHANTRE, P.; VANDERMANDER, J. Efficacy of a green tea extract rich in catechin polyphenols and caffeine in increasing 24-h energy expenditure and fat oxidation in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, p. 1040-1045, 1999.

EDWARDS, R.L.; LYON, T.; LITWIN, S.E.; RABOVSKY, A.; SYMONS, J.D.; JALILI, T. Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 11, p. 2405-2411, 2007.

EFRAIM, P.; ALVES, A.B.; JARDIM, D.C.P. Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 3, p. 181-201, 2011.

EVANS, G.; HOLLINSHEAD, F.K.; MAXWELL, W.M.C. Preservation and artificial insemination of sexed semen in sheep. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, p. 455-464, 2004.

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.



FERRUSOLA C.O., FERNANDEZ L.G., SANDOVAL C.S., GARCIA B.M., MARTINEZ H.R., TAPIA J.A., PENA F.J. Inhibition of the mitochondrial permeability transition pore reduces "apoptosis like" changes during cryopreservation of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 7, n. 3, p. 458-465, 2010.

FLAHERTY, S.P.; MATTHEWS, C.D. Application of modern molecular techniques to evaluate sperm sex selection methods. **Molecular Human Reproduction**, v. 2, n. 12, p. 937-942, 1996.

GADELLA, B.M. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 229-236, 2008.

GARCEZ, M.E.; BRANCO, C.S.; LARA, L.V.; PASQUALOTTO, F.F.; SALVADOR, M. Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 6, p. 2118-2121, 2010.

GARNER, D.L. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. **Theriogenology**, v. 65, p. 943-957, 2006.

GARNER, D.L. Sex-sorting mammalian sperm: concept to application in animals. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 4, p. 519-526, 2001.

GIBB, Z.; BUTLER, T.J.; MORRIS, L.H.A.; MAXWELL, W.M.C.; GRUPEN, C.G. Quercetin improves the postthaw characteristics of cryopreserved sex-sorted and nonsorted stallion sperm. **Theriogenology**, v. 79, n. 6, p. 1001-1009, 2013.

GU, J.-W.; MAKEY, K.L.; TUCKER, K.B.; CHINCHAR, E.; MAO, X.; PEI, I.; THOMAS, E.Y.; MIELE, L. EGCG, a major green tea catechin suppresses breast tumor angiogenesis and growth via inhibiting the activation of HIF-1 $\alpha$  and NF $\kappa$ B, and VEGF expression. **Vascular Cell**, v. 5, n. 9, p. 1-10, 2013.

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.

HABERMANN, F.A.; WINTER, A.; OLSAKER, I.; REICHERT, P.; FRIES, R. Validation of sperm sexing in the cattle (*Bos taurus*) by dual colour fluorescence in situ hybridization. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 122, n. 1, p. 22-27, 2005.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7<sup>a</sup> ed. Barueri: Editora Manole, 2004. 513 p.

HANDBOOKS. **Percoll methodology and applications**. Amersham Biosciences, 2001. <http://202.38.193.234/spfx1/admin/picture/200752919841517.pdf>

HASSAN, Z.M.R.; DIN, H.M.F.E.; ALI, A.A.; MEHANNA, N.S.; EL-MESSERY, T.M. Interaction of some low molecular weight phenolics with milk proteins. **World Applied Sciences Journal**, v. 23, n. 2, p. 182-187, 2013.

HENDRIKSEN, P.J.M. Do X and Y spermatozoa differ in proteins?. **Theriogenology**, v. 52, p. 1295-1307, 1999.

HEO, H.J.; LEE, C.Y. Epicatechin and Catechin in Cocoa Inhibit Amyloid  $\beta$  Protein Induced Apoptosis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n. 5, p. 1445-1448, 2005.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000.

HOLT, W.V.; HEAD, M.F.; NORTH, R.D. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 1086-1094, 1992.

HOSSEPIAN de LIMA, V.F.M.; MOREIRA-FILHO, C.A.; LUCIO, A.C.; RESENDE, M.V. Sexagem de espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente descontínuo de densidade de Percoll1. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 8, p. 1680-1685, 2011.

HOSSEPIAN de LIMA, V.F.M. Avanços metodológicos na seleção do sexo de espermatozoides bovinos para utilização no melhoramento genético e na produção animal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 219-228, 2007.

HOSSEPIAN de LIMA, V.F.M.; MOREIRA-FILHO, C.A.; RAMALHO, M.F.P.D.-T. Processo de seleção do sexo de espermatozoides em mamíferos e métodos de controle de qualidade de doses de “sêmen sexado” congelado. **BR PI 0300604-2**, 17 Jun. 2003.

HOSSEPIAN de LIMA, V.F.M.; RAMALHO, M.D.T.; RODRIGUES, L.H.; MALHEIROS, E.B.; MOREIRA-FILHO, C.A. Separation of X- and Y-bearing bovine spermatozoa by Percoll density gradient centrifugation. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 480, 2000.

JANEIRO, P.; BRETT, A.M.O. Catechin electrochemical oxidation mechanisms. **Analytica Chimica Acta**, v. 518, p. 109-115, 2004.

JOHNSON, L.A. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 93-107, 2000.

JONES, R.; MANN, T. Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 50, p. 261-268, 1977.

KALENDER, S.; KALENDER, Y.; ATES, A.; YEL, M.; OLCAY, E.; CANDAN, S. Protective role of antioxidant vitamin E and catechin on idarubicin-induced cardiotoxicity in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 1379-1387, 2002.

KANESHARATNAM, N.; ESWARAMOHAN, T.; BALASUBRAMANIAM, K. Fractionation of X and Y chromosome-bearing bovine spermatozoa through sugar gradients for sex predetermination in dairy cattle. **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, v. 2, n. 3, p. 203-206, 2012.

KELLY, G.S. Quercetin. **Alternative Medicine Review**, v. 16, n. 2, p. 172-194, 2011.

KENNEDY, J.H.; KORN, N.; THURSTON, R.J. Prostaglandin levels in seminal plasma and sperm extracts of the domestic turkey, and the effects of cyclooxygenase inhibitors on sperm mobility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 1-7, 2003.

KHAKI, A.; FATHIAZAD, F.; NOURI, M.; KHAKI, A.A.; MALEKI, N.A.; KHAMNEI, H.J.; AHMADI, P. Beneficial effects of quercetin on sperm parameters in streptozotocin-induced diabetic male rats. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 1285-1291, 2010.

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

KLINC, P.; FRESE, D.; OSMERS, H.; RATH, D. Insemination with sex sorted fresh bovine spermatozoa processed in the presence of antioxidative substances. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 1, p. 58-62, 2007.

KLINC, P.; RATH, D. Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 42, n. 1, p. 63-67, 2007.

KLINC, P.; RATH, D. Application of flowcytometrically sexed spermatozoa in different farm animal species: a review. **Arch Tierz Dummerstorf**, v. 49, n. 1, p. 41-54, 2006.

KOBAYASHI, J.; OGURO, H.; UCHIDA, H.; KOHSAKA, T.; SASADA, H.; SATO, E. Assessment of bovine X- and Y-bearing spermatozoa in fractions by discontinuous Percoll gradients with rapid fluorescence *in situ* hybridization. **Journal of Reproduction and Development**, v. 50, n. 4, 2004.

KOWALSKA, A.; KOWALSKI, R.K.; ZAKĘŚ, Z. The effect of selective cyclooxygenase (COX) inhibitors on japanese medaka (*Oryzias latipes*) reproduction parameters. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 53, p. 19-23, 2011.

KUNDU, J.K.; NA, H.-K.; CHUN, K.-S.; KIM, Y.-K.; LEE, S.J.; LEE, S.S.; LEE, O.-S.; SIM, Y.-C.; SURH, Y.-J. Inhibition of phorbol ester-induced COX-2 expression by epigallocatechin gallate in mouse skin and cultured human mammary epithelial cells. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 11, p. 3805S-3810S, 2003.

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

LI, F.; GONG, Q.; DONG, H.; SHI, J. Resveratrol, a neuroprotective supplement for alzheimer's disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, p. 27-33, 2012.

LI, Y. **Antioxidants in biology and medicine: essentials, advances, and clinical applications**. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2011, 422 p.

LI, D.; CHEN, X.; YU, H. Resveratrol inhibits MMP-2 expression of hepatoma in nude mice. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 10, n. 1, p. 33-37, 2011.

LIMA, L.R.P.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; STRINGHETA, P.C.; TINOCO, A.L.A.; SILVA, J.F. Bixina, Norbixina e Quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 4, p. 196-200, 2001.

LIN, S.-P.; LEE, R.K.-K.; TSAI, Y.-J.; HWU, Y.-M.; LIN, M.-H. Separating X-bearing human spermatozoa through a discontinuous Percoll density gradient proved to be inefficient by double-label fluorescent in situ hybridization. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 15, n. 9, p. 565-569, 1998.

LUCIO, A.C.; RESENDE, M.V.; DERNOWSECK-MEIRELLES, J.A.; PERINI, A.P.; OLIVEIRA, L.Z.; MIGUEL, M.C.V.; CARMO, A.S.; TOMITA, S.Y.; ALVES, B.C.A.; FAZANO, F.A.T.; LIMA, V.F.M.H. Assessment of swim-up and discontinuous density gradient in sperm sex preselection for bovine embryo production. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 3, p. 525-532, 2012.

MABE, K.; YAMADA, M.; OGUNI, I.; TAKAHASHI, T. *In vitro* and *in vivo* activities of tea catechins against helicobacter pylori. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 7, p. 1788-1791, 1999.

MACHADO, H.; NAGEM, T.J.; PETERS, V.M.; FONSECA, C.S.; OLIVEIRA, T.T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.

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.

MAMEDE, M.E.O.; PASTORE, G.M. Compostos fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 233-252, 2004.

MANEESH, M.; JAYALEKSHMI, H. Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 21, n. 2, p. 80-89, 2006.

MARCHESI, D.E.; FENG, H.L. Sperm DNA integrity from sperm to egg. **Journal of Andrology**, v. 28, n. 4, p. 481-489, 2007.

MARTÍN-HIDALGO, D.; LLERA, A.H.; HENNING, H.; WALLNER, U.; WABERSKI, D.; BRAGADO, M.J.; GIL, M.C.; GARCÍA-MARÍN, L.J. The effect of resveratrol on the quality of extended boar semen during storage at 17°C. **Journal of Agricultural Science**, v. 5, n. 8, p. 231-242, 2013.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, M.<sup>a</sup> J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, v. 17, n. 6, p. 271-278, 2002.

MATÁS, C.; VIEIRA, L.; GARCÍA-VÁZQUEZ, F.A.; AVILÉS-LÓPEZ, K.; LÓPEZ-ÚBEDA, R.; CARVAJAL, J.A.; GADEA, J. Effects of centrifugation through three different discontinuous Percoll gradients on boar sperm function. **Animal Reproduction Science**, v. 127, n. 1-2, p.:62-72, 2011.

MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G.; HOLLINSHEAD, F.K.; BATHGATE, R.; DE GRAAF, S.P.; ERIKSSON, B.M. ; GILLAN, L.; MORTON, K.M.; O'BRIEN, J.K. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 79-95, 2004.

MAZZI, L.; GEMINIANI, M.; COLLODEL, G.; IACOPONI, F.; MARTINI, S.; BONECHI, C.; ROSSI, C.; MORETTI, E. Quercetin and rutin: effects of two flavonoids on induced oxidative stress in human ejaculated sperm. **Journal of the Siena Academy of Sciences**, Published Since, v. 3, p. 22-26, 2011.

McNIVEN, M.A.; RICHARDSON, G.F. Chilled Storage of Stallion Semen Using Perfluorochemicals and Antioxidants. **Cell Preservation Technology**, v. 1, n. 3, p. 165-174, 2003.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 5ª ed. Porto Alegre: Livraria Sulina Editora, 1982. 783 p.

MIRA, N.V.M.; BARROS, R.M.C.; SCHIOCCHET, M.A.; NOLDIN, J.A.; LANFERMARQUEZ, U.M. Extração, análise e distribuição dos ácidos fenólicos em genótipos pigmentados e não pigmentados de arroz (*Oryza sativa L.*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 994-1002, 2008.

MISHRA, R.N. Resveratrol – The New Rasayan (Anti aging) Drug. **Current Research in Medicine and Medical Sciences**, v. 1, n. 1, p. 5-18, 2011.

MOHRI, H.; OSHIO, S.; KANEKO, S.; KOBAYASHI, T.; IIZUKA, R. Separation and Characterization of Mammalian X- and Y-bearing Sperm. **Development, Growth and Differentiation**, v. 28, n. s1, p. 35-36, 1986.

MORAES, C.N.; NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D.; OLIVEIRA, J.F.C.; SCHWEITZER, C.M. Criopreservação do sêmen ovino em *pellets* com etileno glicol. **Ciência Rural**, v. 28, n. 2, p. 287-292, 1998.

MORETTI, E.; MAZZI, L.; TERZUOLI, G.; BONECHI, C. ; IACOPONI, F.; MARTINI, S.; ROSSI, C.; COLLODEL, G. Effect of quercetin, rutin, naringenin and epicatechin on lipid peroxidation induced in human sperm. **Reproductive Toxicology**, v. 34, p. 651- 657, 2012.

MORTIMER, S.T.; MAXWELL, W.M.C. Effects of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction**, v. 127, p.285-291, 2004.

MURTA, D.V.F.; GOMES, V.C.L.; MARTINEZ, L.C.R. Uso de sêmen sexado em bovinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 11, n. 20, 2013.

NAGAO, T.; KOMINE, Y.; SOGA, S.; MEGURO, S.; HASE, T.; TANAKA, Y.; TOKIMITSU, I. Ingestion of a tea rich in catechins leads to a reduction in body fat and malondialdehyde-modified LDL in men. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 122-129, 2005.

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

NATH, S.; BACHANI, M.; HARSHAVARDHANA, D.; STEINER, J.P. Catechins protect neurons against mitochondrial toxins and HIV proteins via activation of the BDNF pathway. **Journal of Neurovirology**, v. 18, n. 6, p. 445-55, 2012.

NUNES, J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução de pequenos ruminantes**. Fortaleza: Tecnograf, 2010. 208 p.

OLIVEIRA, M.E.F.; TEIXEIRA, P.P.M.; VICENTE, W.R.R. **Biotécnicas reprodutivas em ovinos e caprinos**. 1<sup>a</sup> Ed. São Paulo: Med Vet, 2013. 305 p.

OLIVEIRA, L.Z.; ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.; de ANDRADE, A.F.; PERINI, A.P.; RESENDE, M.V.; MIGUEL, M.C.; LUCIO, A.C.; HOSSEPIAN de LIMA, V.F. Effects of discontinuous Percoll gradient centrifugation on the quality of bovine spermatozoa evaluated with computer-assisted semen analysis and fluorescent probes association. **Andrologia**, v. 44, n. 1, p. 9-15, 2012.

OLIVEIRA, L.Z.; ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ANDRADE, A.F.C.; HOSSEPIAN de LIMA, V.F.M. Taxa de recuperação e características espermáticas após a sexagem por centrifugação em gradiente de densidade em espermatozoides descongelados. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 1, p. 41-48, 2011a.

OLIVEIRA, R.V.; NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M.; CAVALCANTE, J.M.M.; BRASIL, O.O.; MOURA, A.A.A.N. Avaliação de espermatozoides caprinos congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101®) ou TRIS. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 6, n. 6, p. 1295-1302, 2011b.

ORTEGA, A.M.; IZQUIERDO, A.C.; GÓMEZ, J.J.H.; OLIVARES-CORICHI, I.M.; TORRES, V.M.M.; MÉNDEZ, J.J.V. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. **Interciencia**, v. 28, n. 12, p. 699-704, 2003.

PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J.M.; ROCA, J.; MARTINEZ, E.A. Flow cytometry identification of X- and Y-chromosome-bearing goat spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, p. 58-60, 2004.

PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability and cryopreservation. **Micron**, v. 37, p. 597-612, 2006.

PETROVSKI, G.; GURUSAMY, N.; DAS, D.K. Resveratrol in cardiovascular health and disease. **Annals of the New York Academy**, v. 1215, v.22-33, 2011.

PLANAS, J.M.; COLOM, H.; JUAN, M.E. Resveratrol: A polyphenol with multiple effects. **Recent Advances in Pharmaceutical Sciences**, v. 2, p. 101-120, 2011.

POOL, H.; QUINTANAR, D.; FIGUEROA, J.D.; MANO, C.M.; BECHARA, J.E.H.; GODÍNEZ, L.A.; MENDOZA, S. Antioxidant Effects of Quercetin and Catechin Encapsulated into PLGA Nanoparticles. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, p. 1-12, 2012.

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

PURDY, P.H. ; ERICSSON, S.A.; DODSON, R.E.; STERNES, K.L.; GARNER, D.L. Effects of the flavonoids, silibinin and catechin, on the motility of extended cooled caprine sperm. **Small Ruminant Research**, v. 55, p. 239-243, 2004.

RAHMAN, A.N.Md.A.; ABDULLAH, R.B.; KHADIJAH, W.E.W. A review of reproductive biotechnologies and their application in goat. **Biotechnology**, v.7, n. 2, p. 371-384, 2008.

RANAWAT, P.; KAUSHIK, G.; SAIKIA, U.N.; PATHAK, C.M.; KHANDUJA, K.L. Quercetin impairs the reproductive potential of male mice. **Andrologia**, v. 45, n. 1, p.56-65, 2013.

RESENDE, M.V.; LUCIO, A.C.; PERINI, A.P.; OLIVEIRA, L.Z.; ALMEIDA, A.O.; ALVES, B.C.A.; MOREIRA-FILHO, C.A.; SANTOS, I.W.; HOSSEPIAN de LIMA, V.F.M. Comparative validation using quantitative real-time PCR (qPCR) and conventional PCR of bovine semen centrifuged in continuous density gradient. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 3, p. 544-551, 2011.

RESENDE, M.V.; LÚCIO, A.C.; PERINI, A.P.; OLIVEIRA, L.Z.; ALMEIDA, A.O.; GUSMÃO, A.L.; LIMA, V.F.M.H. Desvio da proporção de sexo e integridade do DNA dos espermatozoides bovinos centrifugados em gradientes de densidade contínuos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 11, n. 1, p. 260-269, 2010.

RESENDE, M.V.; BEZERRA, M.B.; PERECIN, F.; ALMEIDA, A.O.; LUCIO, A.C.; HOSSEPIAN de LIMA, V.F.M. Separation of X-bearing bovine sperm by centrifugation in continuous Percoll and optiprep density gradient: effect in sperm viability and *in vitro* embryo production. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 581-587, 2009.

ROLDAN, E.R.S. Role of phospholipases during sperm acrosomal exocytosis. **Frontiers in Bioscience**, v. 3, p. d1109-1119, 1998.

ROTAVA, R.; ZANELLA, I.; SILVA, L.P.; MANFRON, M.P.; CERON, C.S.; ALVES, S.H.; KARKOW, A.K.; SANTOS, J.P.A. Atividade antibacteriana, antioxidante e tanante de subprodutos da uva. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 941-944, 2009.

SAIGG, L.N.; SILVA, M.C. Efeitos da utilização do chá verde na saúde humana. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 7, n. 1, p. 69-89, 2009.

SAITO, S.T.; WELZEL, A.; SUYENAGA, E.S.; BUENO, F. A method for fast determination of epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin (EC), catechin (C) and caffeine (CAF) in green tea using HPLC. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 394-400, 2006.



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

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, v. 38, p. 1-36, 1995.

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.

SAMARDŽIJA, M.; DOBRANIĆ, T.; KARADJOLE, M.; GETZ, I.; VINCE, S.; GRAČNER, D.; MAČEŠIĆ, N.; FILAKOVIĆ, I. The efficacy of gradient Percoll<sup>®</sup> on bull sperm separation for *in vitro* fertilization. **Veterinarski arhiv**, v. 76, n. 1, p. 37-44, 2006.

SANOČKA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, p. 12-18, 2004.

SARLÓS, P.; MOLNÁR, A.; KÓKAI, M.; GÁBOR, G.; RÁTKY, J. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 50, p. 235- 45, 2002.

SATORRE, M.; CÓRDOBA, M. Involvement of intracellular calcium and *src* tyrosine-kinase in capacitation of cryopreserved bovine spermatozoa. **InVet**, v. 12, n. 1, p. 75-83, 2010.

SAUTTER, C.K.; DENARDIN, S.; ALVES, A.O.; MALLMANN, C.A.; PENNA, N.G.; HECKTHEUER, L.H.. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 3, p. 437-442, 2005.

SAVI, L.A.; BARARDI, C.R.; SIMÕES, C.M. Evaluation of antiherpetic activity and genotoxic effects of tea catechin derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2552-2557, 2006.

SCHLACHTERMAN, A.; VALLE, F.; WALL, K.M.; AZIOS, N.G.; CASTILLO, L.; MORELL, L.; WASHINGTON, A.V.; CUBANO, L.A.; DHARMAWARDHANE, S.F. Combined Resveratrol, Quercetin, and Catechin Treatment Reduces Breast Tumor Growth in a Nude Mouse Model. **Translational Oncology**, v. 1, n. 1, p. 19-27, 2008.

SCHUH, K.; CARTWRIGHT, E.J.; JANKEVICS, E.; BUNDSCHU, K.; LIEBERMANN, J.; WILLIAMS, J.C.; ARMESILLA, A.L.; EMERSON, M.; OCEANDY, D.; KNOBELOCH, K.-P., NEYSES, L. Plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 27, p. 28220-28226, 2004.

SEIDEL Jr, G.E. Sexing mammalian sperm – intertwining of commerce, technology, and biology. **Animal Reproduction Science**, v. 79, n. 3 , p. 145-156, 2003.

SEIDEL Jr, G.E.; GARNER, D.L. Current status of sexing mammalian spermatozoa. **Reproduction**, v. 124, p. 733-743, 2002.

SENGER, A.L.V.; SCHWANKE, C.H. A.; GOTTLIEB, M.G.V. Chá verde (*Camellia sinensis*) e suas propriedades funcionais nas doenças crônicas não transmissíveis. **Scientia Medica**, v. 20, n. 4, p. 292-300, 2010.

SHARPE, J.C.; EVANS, K.M. Advances in flow cytometry for sperm sexing. **Theriogenology**, v. 71, p. 4-10, 2009.

SIKDAR, R.; GANGULY, U.; CHANDRA, S.; ADHIKARY, G.; SEN, P.C. Calcium uptake and Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity in goat spermatozoa membrane vesicles do not require Mg<sup>2+</sup>. **Journal of Biosciences**, v. 18, n. 1, p. 73-82, 1993.

SIKKA, S.C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 1, p. 5-18, 2004.

SILLS, E.S; KIRMAN, I.; THATCHER III, S.S.; PALERMO, G.D. Sex-selection of human spermatozoa: evolution of current techniques and applications. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 261, n. 3, p. 109-115, 1998.

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

SILVA, E.C.B.; GUERRA, M.M.P. Terapias antioxidantes na criopreservação espermática. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 111, n. 583-584, p. 143-149, 2012.

SIMOS, Y.V.; VERGINADIS, I.I.; TOLIOPOULOS, I.K.; VELALOPOULOU, A.P.; KARAGOUNIS, I.V.; KARKABOUNAS, S.C.; M EVANGELOU, A.M. Effects of catechin and epicatechin on superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity, *in vivo*. **Redox Report**, v. 17, n. 5, p. 181-186, 2012.

SONG, J.-M.; LEE, K.-H.; SEONG, B.-L. Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. **Antiviral Research**, v. 68, p. 66-74, 2005.

STERVBO, U.; VANG, O.; BONNESEN, C. A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. **Food Chemistry**, v. 101, p. 449–457, 2007.

STERVBO, U.; VANG, O.; BONNESEN, C. Time- and concentration-dependent effects of resveratrol in HL-60 and HepG2 cells. **Cell Proliferation**, v. 39, p. 479-493, 2006.

STOJANOVIĆ, S.; SPRINZ, H.; BREDE, O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 391, n. 1, p. 79-89, 2001.

STORNELLI, M.C.; TITTARELLI, C.M.; SAVIGNONE, C.A.; STORNELLI, M.A. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. **Analecta Veterinaria**, v. 25, n. 2, p. 28-35, 2005.

SUREKA, P.; NILANI, K.; ESWARAMOHAN, T.; BALASUBRAMANIAM, K. Sex Pre-selection by Quantification of Y-Chromosome bearing spermatozoa in goat sperm. **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 3, n. 1, 2013.

TORREGGIANI, A.; TAMBA, M.; TRINCHERO, A.; BONORA, S. Copper(II)-quercetin complexes in aqueous solutions: spectroscopic and kinetic properties. **Journal of Molecular Structure**, v. 744-747, p. 759-766, 2005.

TRELA, B.C.; WATERHOUSE, A.L. Resveratrol: Isomeric molar absorptivities and stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 5, p. 1253-1257, 1996.

TURRENS, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **Journal of Physiology**, v.552, n. 2, p. 335-344, 2003.

VACCARI, N.F.S.; SOCCOL, M.C.H.; IDE, G.M. Compostos fenólicos em vinhos e seus efeitos antioxidantes na prevenção de doenças. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 8, n. 1, p. 71-83, 2009.

VALLORANI, C.; SPINACI, M.; BUCCI, D.; TAMANINI, C.; GALEATI, G. Effects of antioxidants on boar spermatozoa during sorting and storage. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 1, p. 58-65, 2010.

VAN MUNSTER, E.B.; STAP, J.; HOEBE, R.A.; te MEERMAN, G.J.; ATEN, J.A. Difference in sperm head volume as a theoretical basis for sorting X- and Y-bearing spermatozoa: potentials and limitations. **Theriogenology**, v. 52, p.1281-1293, 1999.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

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

WANG, K.; LIU, R.; LI, J.; MAO, J.; LEI, Y.; WU, J.; ZENG, J.; ZHANG, T.; WU, H.; CHEN, L.; HUANG, C.; WEI, Y. Quercetin induces protective autophagy in gastric cancer cells: involvement of Akt-mTOR- and hypoxia-induced factor 1 $\alpha$ -mediated signaling. **Autophagy**, v. 7, n. 9, p. 966-978, 2011.

WANG, S.; NOH, S.K.; KOO, S.I. Green tea catechins inhibit pancreatic phospholipase A2 and intestinal absorption of lipids in ovariectomized rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, n. 7, p. 492-498, 2006.

WANG, X.; SHARMA, R.K.; SIKKA, S.C.; THOMAS, A.J. JR; FALCONE, T.; AGARWAL, A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. **Fertility and Sterility**, v. 80, n. 3, p. 531-535, 2003.

WANG, H.-X.; FLAHERTY, S.P.; SWANN, N.J.; MATTHEWS, C.D. Genetics: Discontinuous Percoll gradients enrich X-bearing human spermatozoa: a study using double-label fluorescence int-situ hybridization. **Human Reproduction**, v. 9, n. 7, p. 1265-1270, 1994.

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

WEINREB, O.; AMIT, T.; MANDEL, S.; YODIM, M.B.H. Neuroprotective molecular mechanisms of (-)-epigallocatechin-3-gallate: a reflective outcome of its antioxidant, iron chelating and neuritogenic properties. **Genes and Nutrition**, v. 4, p. 283-296, 2009.

WHEELER, M.B.; RUTLEDGE, J.J.; FISCHER-BROWN, A.; VANETTEN, T.; MALUSKY, S.; BEEBE, D.J. Application of sexed semen technology to *in vitro* embryo production in cattle. **Theriogenology**, v. 65, p. 219-227, 2006.

WILLIAMS, K.M.; FORD, W.C.L. Effects of Ca-ATPase inhibitors on the intracellular calcium activity and motility of human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 26, p. 366-375, 2003.

WILLIAMSON, G.; MANACH, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 243S-255S, 2005.

- YENI, D.; GUNDOGAN, M.; CIGERCI, I.H.; AVDATEK, F.; FIDAN, A.F. Seasonal variation of oxidative stress parameters in ram seminal plasma. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, n.1, p. 49-54, 2010.
- ZAVERI, N.T. Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications. **Life Sciences**, v. 78, p. 2073-2080, 2006.
- ZHENG, J.; RAMIREZ, V.D. Inhibition of mitochondrial proton F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, 1115-1123, 2000.
- ZHU, Q.Y.; ZHANG, A.; TSANG, D.; HUANG, Y.; CHEN, Z. Stability of green tea catechins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 4624-4628, 1997.
- ZINI, A.; LIBMAN, J. Sperm DNA damage: Clinical significance in the era of assisted reproduction. **Canadian Medical Association Journal**, v. 175, n. 5, p. 494-500, 2006.
- ZRIBI N.; CHAKROUN, N.F.; ABDALLAH, F.B.; ELLEUCH, H.; SELLAMI, A.; GARGOURI, J.; REBAI, T.; FAKHFAKH, F; KESKES, L.A. Effect of freezing–thawing process and quercetin on human sperm survival and DNA integrity. **Cryobiology**, v. 65, p. 326-331, 2012.
- ŽUJOVIĆ, M.; MEMIŠI, N.; IVANOVIĆ, S. Present status, possibilities and perspective of development of goat production in republic of serbia. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 27, n. 3, p. 431-443, 2011.

## **4 EXPERIMENTOS**

#### **4.1 (+)-Catequina e (-)-epigallocatequina galato: terapias antioxidantes promissoras para o sêmen congelado caprino?**

*(+)-Catechin and (-)-epigallocatechin gallate: are these promising antioxidant therapies for frozen goat semen?*

Ellen Cordeiro Bento da Silva<sup>a</sup>, Lúcia Cristina Pereira Arruda<sup>a</sup>, Sildivane Valcácia Silva<sup>b</sup>,  
Helder Melo de Souza<sup>a</sup>, Maria Madalena Pessoa Guerra<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Andrologia, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 52.171-900, Pernambuco, Brasil

<sup>b</sup>Departamento de Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 58.051-900, Paraíba, Brasil

#### **RESUMO**

Objetivou-se neste estudo avaliar o efeito da (+)-catequina ou da (-)-epigallocatequina galato (EGCG) sobre a congelabilidade do sêmen caprino. Amostras de sêmen de seis caprinos foram agrupadas em *pool*, processadas de acordo com os experimentos e grupos experimentais [Experimento 1: 0 (controle), 15, 25, 50, 75 ou 100  $\mu$ M de catequina; Experimento 2: 0 (controle), 15, 25, 50, 75 ou 100  $\mu$ M de EGCG] e congeladas. Após descongelação, alíquotas de sêmen foram avaliadas quanto a cinética espermática, integridade de membrana plasmática e acrossomal, morfologia e estresse oxidativo nos tempos 0 e 1 h de incubação. No Experimento 1, imediatamente após descongelação, VSL (velocidades linear progressiva) e VAP (velocidade média da trajetória) foram maiores ( $P < 0,05$ ) com 15  $\mu$ M de catequina do que com 50 e 100  $\mu$ M; WOB (oscilação) foi maior ( $P < 0,05$ ) com 0, 15 e 25  $\mu$ M de catequina do que com 100  $\mu$ M; e BCF (batimento flagelar cruzado) foi maior ( $P < 0,05$ ) com 75 e 100  $\mu$ M de catequina do que com 0  $\mu$ M. Para o Experimento 2 no tempo 0 h, a motilidade progressiva foi maior ( $P < 0,05$ ) com 0 e 15  $\mu$ M de EGCG do que com 50 e 75  $\mu$ M; e a LIN (linearidade) foi maior ( $P < 0,05$ ) com 0  $\mu$ M de EGCG do que com 100  $\mu$ M. Assim, a (+)-catequina hidratada e a EGCG, em altas concentrações (50 a 100  $\mu$ M), têm efeito inibidor transitório sobre a cinética de espermatozoides congelados de caprino. Este resultado, em associação à ausência de mudanças significativas em relação ao grupo controle (0  $\mu$ M) e ao efeito positivo e

promissor da EGCG sobre a membrana plasmática e o estresse oxidativo, impossibilita afirmar se a catequina e a EGCG são terapias promissoras para a criopreservação do sêmen caprino.

**Palavras chave:** criopreservação de sêmen; estresse oxidativo; flavonoides; terapia antioxidante.

### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of (+)-catechin or (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) on goat semen freezability. Semen samples from six goats were pooled, processed according to experiment and experimental groups [Experiment 1: 0 (control), 15, 25, 50, 75 or 100  $\mu\text{M}$  (+)-Catechin hydrate; Experiment 2: 0 (control), 15, 25, 50, 75 or 100  $\mu\text{M}$  EGCG] and frozen. After thawing, aliquots of semen were evaluated for sperm kinematics, plasma membrane and acrosome integrity, morphology and oxidative stress after 0 and 1 h of incubation. In Experiment 1 at 0 h, VSL (straight linear velocity) and VAP (average path velocity) were higher ( $P<0.05$ ) in 15  $\mu\text{M}$  catechin than in 50 and 100  $\mu\text{M}$ ; WOB (wobble) was higher ( $P<0.05$ ) in 0, 15 and 25  $\mu\text{M}$  catechin than in 100  $\mu\text{M}$ ; and BCF (beat cross frequency) was higher ( $P<0.05$ ) in 75 and 100  $\mu\text{M}$  catechin than in 0  $\mu\text{M}$ . In Experiment 2 at 0 h, progressive motility was greater ( $P<0.05$ ) with 0 and 15  $\mu\text{M}$  EGCG than with 50 and 75  $\mu\text{M}$ ; and LIN (linearity) was higher with 0  $\mu\text{M}$  EGCG than with 100  $\mu\text{M}$ . Thus, at high concentrations (50 to 100  $\mu\text{M}$ ), (+)-catechin hydrate and EGCG have transitory inhibitory effect on the sperm kinematics of frozen goat semen. This result, in association with the absence of considerable changes compared to the control group (0  $\mu\text{M}$ ) and to positive and promissory effect of EGCG on plasma membrane and oxidative stress, makes it impossible to affirm whether catechin and EGCG are promising therapies for goat semen cryopreservation.

**Keywords:** antioxidant therapy; flavonoids; oxidative stress; semen cryopreservation.

### INTRODUÇÃO

A (+)-catequina e a epigallocatequina galato (EGCG) são flavanóis encontrados em alimentos e bebidas de origem vegetal (WILLIAMSON e MANACH, 2005; WEINREB et al., 2009; LI, 2011). Estes compostos fitoquímicos são considerados antioxidantes mais



potentes do que outros agentes, o que resulta de suas estruturas químicas (ZAVERI, 2006; WEINREB et al., 2009). Os efeitos protetores das catequinas decorrem de sua capacidade em doar íons hidrogênio, regular a expressão de enzimas antioxidantes (LI, 2011; SIMOS et al., 2012), inibir enzimas pró-oxidantes (HEO e LEE, 2005; LI, 2011), em quelar íons metálicos (CHOBOT et al., 2009; LI, 2011) e proteger outros antioxidantes (LOTITO e FRAGA, 2000).

Alguns dos efeitos benéficos das catequinas *in vitro* e *in vivo* têm sido evidenciados, dentre os quais estão a atividade antibacteriana (MABE et al., 1999), antiviral (SONG et al., 2005; BASTIANETTO et al., 2010), anti-fúngica (HIRASAWA e TACADA, 2004), antitumoral (SCHLACHTERMAN et al., 2008; GU et al., 2013) e antiobesidade (DULLO et al., 1999; NAGAO et al., 2005). Além disso, estes flavonoides têm ação como neuroprotetores (WEINREB et al., 2009; NATH et al., 2012) e protetores de gametas e embriões (PURDY et al., 2004; WANG et al., 2007; BOONSORN et al., 2010; VALLORANI et al., 2010; De AMICIS et al., 2012).

A criopreservação do sêmen é de grande importância entre as biotécnicas da reprodução, visto que oferece muitas vantagens à indústria da produção animal (SALAMON e MAXWELL, 1995; BALDASSARRE e KARATZAS, 2004) e contribui para o crescimento de outras técnicas de reprodução assistida (BARBAS e MASCARENHAS, 2009). Em contrapartida, durante o processo de criopreservação, particularmente durante a congelamento e descongelamento, a célula espermática é frequentemente lesada (LEBOEUF et al., 2000; DORADO et al., 2010), o que reduz sua viabilidade e função (BANSAL e BILASPURI, 2011).

A geração de injúrias aos espermatozoides, durante o processo de congelamento, tem sido atribuída ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (WATSON, 2000; BANSAL e BILASPURI, 2011). As ROS são deletérias às moléculas biológicas (SALEH e AGARWAL, 2002), o que torna os espermatozoides suscetíveis ao seu ataque e à peroxidação lipídica (SIKKA, 2004; BANSAL e BILASPURI, 2011). Assim, foi objetivado neste estudo avaliar o efeito de diferentes concentrações de (+)-catequina ou de EGCG sobre a congelabilidade do sêmen caprino.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

A menos quando especificado, todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

### **Animais e local do estudo**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE - Brasil), sobre número de processo CEEUA/UFRPE 014/2012. Foram utilizados seis reprodutores caprinos férteis (três Saanen, dois Toggenburg e um Alpino Britânico), com idades entre um e quatro anos. Os animais foram criados na UFRPE, Pernambuco, Brasil (08° 03' 14'' S; 34° 52' 52'' W) e alimentados com feno de tifton e concentrado, além de água e sal mineral.

### **Colheita de sêmen**

O sêmen foi colhido usando vagina artificial e uma fêmea como manequim. As colheitas foram realizadas três vezes por semana a partir de seis reprodutores caprinos, totalizando 36 ejaculados por experimento; seis para cada animal (n=6). As amostras de sêmen *in natura* foram avaliadas subjetivamente, em microscópio de contraste de fase (Olympus, Tóquio, Japão), quanto ao turbilhonamento (0-5), motilidade (0-100%) e vigor (0-5) em aumento de 100 X. Para a determinação da concentração espermática foi utilizada a câmara de Neubauer (400 X), enquanto que para a morfologia espermática foi utilizado o método de câmara úmida (1000 X); após diluição em solução de formol citrato (1:400; v:v). Os ejaculados aprovados (turbilhonamento  $\geq 3$ , motilidade  $\geq 70\%$ , vigor  $\geq 3$ , concentração  $\geq 2 \times 10^9$  espermatozoides/mL e alterações morfológicas totais  $\leq 20\%$ ) foram destinados à formação do *pool* seminal, totalizando seis *pools* (n=6) por experimento.

### **Diluição e congelamento do sêmen**

Cada um dos seis *pools* de sêmen foi diluído em solução Tris [3,605 g Tris-hidroximetil aminometano (T1378), 2,024 g ácido cítrico (C2402), 1,488 g frutose (F3510)

e 100 mL água Milli-Q, pH 6,8; 1:9 (v:v)] e centrifugado (250 X g / 10 min) duas vezes para a retirada do plasma seminal. Em seguida, as amostras de sêmen foram divididas em seis alíquotas iguais e diluídas em diluidor à base de leite desnatado [10 g leite desnatado em pó, 194 mg D-(+)-glucose (G6152), 100 mL água Milli-Q, 7% glicerol (G2025), pH 6,8], contendo diferentes concentrações (0, 15, 25, 50, 75 e 100  $\mu$ M) de (+)-catequina hidratada (C1251; Experimento 1) ou EGCG (E4143; Experimento 2), de acordo com o experimento. O sêmen diluído para a concentração final de  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL foi envasado em palhetas (0,25 mL) e congelado em sistema automático (TK-3000<sup>®</sup>, TK Tecnologia em Congelação Ltda., Uberaba, Brasil), usando uma curva lenta específica para caprino. Durante a curva positiva, a queda de temperatura foi de 0,25 °C por min, até atingir 5 °C, temperatura na qual as amostras foram mantidas durante 120 min (tempo de estabilização). A curva negativa foi iniciada com queda de temperatura de 20 °C por min até atingir -120 °C, quando então as palhetas foram submersas e estocadas em nitrogênio líquido (-196 °C). As soluções estoque de catequina e de EGCG (10 mM) foram preparadas em DMSO (D4540) e estocadas a -20 °C.

### **Descongelamento e avaliação do sêmen**

Após intervalo mínimo de 24 h da congelamento, foram descongeladas (37 °C / 30 s) quatro palhetas por grupo experimental. Alíquotas de sêmen foram analisadas após 0 e 1 h de incubado a 34 °C, de acordo com as descrições a baixo. Este processo foi realizado seis vezes para cada experimento e grupo experimental (n=6).

### **Cinética espermática**

Alíquotas de sêmen de cada grupo experimental foram diluídas em diluidor à base de leite desnatado (1:4; v:v), a fim de reduzir a concentração espermática ( $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL) e facilitar a captura de imagens, por meio da redução da sobreposição de células espermáticas (MORTIMER, 2000). Uma alíquota de 5  $\mu$ L de cada amostra foi depositada sobre lâmina previamente aquecida (37 °C) e coberta com lamínula. A lâmina foi observada em um microscópio de contraste de fase (aumento de 100 X; Nikon<sup>™</sup> H5505, Eclipse 50i, Tóquio, Japão) e as imagens capturadas utilizando uma câmera de vídeo (Basler Vision Technologie<sup>™</sup> A312FC, Ahrensburg, Alemanha). Foram

analisados cinco campos não consecutivos, selecionados aleatoriamente, por amostra, com registro de, no mínimo, 2000 espermatozoides. Os parâmetros analisados utilizando o Sperm Class Analyzer - SCA<sup>TM</sup> software v. 5.1 (Microptics, S.L., Barcelona, Espanha) foram: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR) e oscilação (WOB), expressos em valores percentuais (%); velocidade curvilínea (VCL), velocidade linear progressiva (VSL) e velocidade média da trajetória (VAP), expressas em micrometros por segundo ( $\mu\text{m/s}$ ); amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) expresso em micrometros ( $\mu\text{m}$ ); e frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), expresso em hertz (Hz).

#### Integridade de membrana plasmática

A integridade da membrana plasmática foi determinada pelo método de coloração dupla com diacetato de carboxifluoresceína (DCF; C5141) e iodeto de propídio (IP; P4170), segundo SILVA et al. (2011). Alíquotas (50  $\mu\text{L}$ ) de sêmen foram diluídas em 150  $\mu\text{L}$  de solução Tris, contendo 5  $\mu\text{L}$  DCF (0,46 mg/mL em DMSO) e 20  $\mu\text{L}$  IP (0,5 mg/mL em PBS), incubadas por 10 min a 37 °C e fixadas com PBS contendo 0,5% de glutaraldeído. Usando filtros DBP 485/20 nm para excitação e DBP 580 a 630-nm para emissão, um total de 200 células por lâmina foi examinado em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha), em um aumento de 400 X. Fluorescências verde ou vermelha foram interpretadas como sendo membrana plasmática intacta ou danificada, respectivamente.

#### Integridade de acrossoma

Para a determinação da integridade do acrossoma, os espermatozoides foram corados com isotiocianato de fluoresceína conjugado a *Peanut agglutinin* (FITC-PNA; L7381), segundo SILVA et al. (2012). Alíquotas (10  $\mu\text{L}$ ) de sêmen foram utilizadas para preparação dos estirados, os quais foram secos a temperatura ambiente. Para corar as células, uma alíquota de 30  $\mu\text{L}$  da solução de FITC-PNA (100  $\mu\text{g/mL}$  em PBS) foi depositada sobre cada lâmina, incubada em câmara úmida a 4 °C por 20 min, lavada em PBS e seca no escuro. No momento da avaliação, 5  $\mu\text{L}$  de meio de montagem [4,5 mL glicerol, 0,5 mL PBS, 5 mg azida sódica (S8032) e 5 mg p-phenylenediamine (P6001)]

foram depositados sobre a lâmina e coberto com lamínula. Um total de 200 espermatozoides por lâmina foi examinado, usando filtros LP 515-nm para emissão e 450 - 490 BP nm para excitação, em um microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha; 1000 X). Os espermatozoides foram classificados como portadores de acrossoma intacto, quando apresentavam a região acrossomal corada em verde fluorescente, ou de acrossoma reagido, quando apresentavam fluorescência apenas na região equatorial da cabeça ou quando não corados em verde fluorescente.

### Morfologia

O método da câmara úmida foi usado para a análise da morfologia espermática (OLIVEIRA et al., 2013). Para isto, amostras de sêmen foram diluídas em solução de formol citrato (1:5; v:v), uma alíquota (10 µL) foi depositada sobre uma lâmina, coberta com lamínula e vedada. Um total de 200 células foi analisado por lâmina, utilizando um microscópio de contraste de fase (Olympus, Tóquio, Japão; 1000 X), e estas foram classificadas como morfologicamente normais ou anormais.

### Estresse oxidativo

O teste de *nitroblue tetrazolium* (NBT; N6639) foi utilizado para estudar o estresse oxidativo dos espermatozoides, conforme descrito por SALEH e AGARWAL (2002). Amostras de sêmen foram diluídas (1:1; v:v) em solução de NBT (0,1% em PBS), incubadas por 30 min a 37 °C e por mais 30 min à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (250 X g / 5 min) e os pellets ressuspensos em solução Tris. Alíquotas (10 µL) deste material foram utilizadas para a preparação dos estiraços, os quais foram secos a temperatura ambiente. Um total de 100 espermatozoides por lâmina foi analisado em microscópio de contraste de fase (Olympus, Tóquio, Japão; 1000 X) e os espermatozoides foram classificados como portadores de estresse oxidativo, quando apresentavam depósito de formazana na região da cabeça e/ou peça intermediária, ou como não portadores de estresse oxidativo, quando o depósito de formazana era inexistente.

## **Análise estatística**

Os resultados foram expressos como médias e desvios padrão (médias  $\pm$  DP). Antes da realização das análises, os dados percentuais de cinética espermática, integridade de membrana plasmática e de acrossoma, espermatozoides morfologicamente normais e de não portadores de estresse oxidativo, de cada tempo avaliado, foram transformados pelo arco seno. Para a detecção de diferenças entre os grupos experimentais, os tratamentos foram comparados post hoc usando o one-way ANOVA e teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer (INSTAT para Windows, versão 3.01). Para todas as análises, os valores foram considerados significativos para  $P < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

Com relação à cinética de espermatozoides caprinos submetidos à congelação na presença de diferentes concentrações de catequina (Experimento 1) observou-se que, imediatamente após a descongelação (0 h; Tabela 1), as VSL e VAP foram maiores ( $P < 0,05$ ) com 15  $\mu\text{M}$  de catequina do que com 50 e 100  $\mu\text{M}$ . A WOB foi ( $P < 0,05$ ) maior com 0, 15 e 25  $\mu\text{M}$  de catequina do que com 100  $\mu\text{M}$ , enquanto que o BCF foi maior ( $P < 0,05$ ) com 75 e 100  $\mu\text{M}$  de catequina do que com 0  $\mu\text{M}$ . Da mesma forma, as amostras de sêmen congeladas com EGCG (Experimento 2) e analisadas imediatamente após a descongelação (Tabela 2) apresentaram maior ( $P < 0,05$ ) motilidade progressiva no grupo controle (0  $\mu\text{M}$ ) e 15  $\mu\text{M}$  de EGCG do que no 50 e 75  $\mu\text{M}$ ; e a LIN foi maior ( $P < 0,05$ ) no grupo controle do que no 100  $\mu\text{M}$  de EGCG.

Não foi observada diferença significativa ( $P > 0,05$ ), entre os grupos experimentais, para os demais parâmetros de cinética avaliados no tempo 0 h, assim como para todas as análises cinéticas realizadas 1 h após descongelação, tanto para o Experimento 1 (Tabela 1) quanto para o Experimento 2 (Tabela 2). Diferenças significativas também não foram observadas ( $P > 0,05$ ) para a integridade de membrana plasmática (Figura 1A) e acrossomal (Figura 1B), porcentagem de espermatozoides com morfologia normal (Figura 1C) e sem estresse oxidativo (Figura 1D) entre os grupos experimentais para os tempos 0 e 1 h após descongelação, nos Experimentos 1 (Tabela 3) e 2 (Tabela 4).

## DISCUSSÃO

Os achados do presente estudo demonstraram que a terapia com (+)-catequina ou EGCG, em concentrações elevadas (50 a 100  $\mu\text{M}$ ), inibiu a cinética espermática em um efeito dose dependente, imediatamente após a descongelação do sêmen. Dentre os parâmetros cinéticos mais comprometidos pela (+)-catequina destacaram-se a VSL e a VAP, enquanto que pela EGCG foram inibidas a motilidade progressiva e a LIN. Tais parâmetros são relacionados com a taxa de fertilidade e o deslocamento progressivo dos espermatozoides (MATOS et al., 2008). No entanto, o efeito inibidor das catequinas teve caráter temporário, de modo que após 1 h de incubação os parâmetros cinéticos foram semelhantes entre os grupos experimentais.

Com base em resultados como estes, por vezes, o uso de EGCG em altas concentrações é descrito como prejudicial aos espermatozoides e relacionado ao aumento na produção de ROS (De AMICIS et al., 2012). No entanto, é importante considerar que as catequinas investigadas neste estudo são inibidoras da F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase (ZHENG e RAMIREZ, 2000) e da ciclo-oxigenase (COX) (NOREEN et al., 1998; KUNDU et al., 2003). Sendo a F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase uma ATP sintase das mitocôndrias, que representa uma das vias para a síntese de ATP (ZHENG e RAMIREZ, 2000), e a COX um regulador da produção de prostaglandinas (moduladores da motilidade espermática) (KENNEDY et al., 2003), as catequinas podem ser consideradas inibidores da motilidade espermática, por natureza.

Entretanto, é possível que o efeito inibidor das catequinas, sobre a cinética espermática de caprinos, tenha ocorrido em sentido defensivo. Tal hipótese pode ser justificada, levando-se em consideração que as mitocôndrias são as principais fontes de ROS dos espermatozoides (KOPPERS et al., 2008) e que, durante a capacitação espermática, ocorre a máxima atividade dessas organelas (CORDOBA et al., 2006, RAMIO-LLUCH et al., 2011). Além disso, a COX é uma enzima envolvida com a capacitação e reação acrossomal (JOYCE et al., 1987); eventos que podem ser desencadeados precocemente durante a criopreservação (WATSON, 2000).

O tratamento com (+)-catequina não melhorou a integridade de membrana plasmática, integridade de acrossoma, porcentual de células morfologicamente normais e sem estresse oxidativo. Por outro lado, a terapia com EGCG, embora sem diferença significativa entre os grupos experimentais, revelou uma forte tendência ( $P=0,06$ ) em

preservar a integridade da membrana plasmática, imediatamente após a descongelação. A ação protetora desta catequina foi dose-dependente, com destaque para a concentração de 100  $\mu\text{M}$ . Para os demais parâmetros analisados, nenhuma melhoria na qualidade espermática foi detectada, a não ser uma tendência da EGCG em reduzir o estresse oxidativo após 2 h de incubação (dados não mostrados).

Em oposição aos achados deste estudo, a catequina determinou melhor preservação da integridade de membrana plasmática e redução da lipoperoxidação de espermatozoides refrigerados suínos (BOONSORN et al., 2010). Da mesma forma, De AMICIS et al. (2012) demonstraram que a incubação do sêmen *in natura* de humano com EGCG em concentrações baixas (2 e 20  $\mu\text{M}$ ) melhor preservou a integridade da membrana plasmática do que o controle e a concentração mais elevada (60  $\mu\text{M}$ ). No entanto, para o estudo com suínos foi utilizado um meio quimicamente definido e no último caso as amostras de sêmen foram livres de plasma seminal, diluídas em um tampão livre de proteínas e mantidas em uma atmosfera controlada.

No presente estudo, embora o plasma seminal tenha sido removido, foi utilizado um diluidor à base de leite e com pH 6,8, bem como na ausência de atmosfera controlada. Contudo, as catequinas têm afinidade por proteínas, tais como as do leite, com as quais podem formar complexos estáveis (ARTS et al., 2002; HASSAN et al., 2013). Além disso, a estabilidade destes flavonoides diminui com o aumento do pH (pH 4-8), o que resulta na sua degradação (ZHU et al., 1997; CHOBOT et al., 2009) e na aquisição de carga negativa, fazendo com que sejam repelidas pela célula (MARTÍNEZ-FLÓREZ, et al., 2002). As catequinas, possivelmente, também sofrem rápida oxidação quando expostas à luz e ao oxigênio atmosférico (NATH et al., 2012). Todos estes fatores comprometem a atividade antioxidante das catequinas (NATH et al., 2012; HASSAN et al., 2013).

Apesar dos relatos sobre o papel bidirecional da EGCG (MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2002; WEINREB et al., 2009), este flavonoide é considerado o mais poderoso antioxidante entre as catequinas (FUJISAWA et al., 2006; ADELA et al., 2010). Deste modo, é justificável que a EGCG, apesar das interferências negativas às quais foi exposta (composição do diluidor, pH e tensão de oxigênio), tenha apresentado melhor efeito protetor do que a catequina. Neste contexto, é nítida a necessidade de serem realizados novos estudos sobre a ação das catequinas durante a criopreservação do sêmen caprino, levando-se em consideração os fatores que influenciam estes agentes. Assim, a partir da



definição de condições adequadas, será possível que as propriedades protetoras das catequinas sejam maximizadas durante a criopreservação do sêmen caprino.

## CONCLUSÃO

A (+)-catequina hidratada e a EGCG, em altas concentrações (50 a 100  $\mu\text{M}$ ), têm efeito inibidor transitório sobre a cinética de espermatozoides congelados de caprino. Este resultado, em associação à ausência de mudanças significativas em relação ao grupo controle e ao efeito positivo e promissor da EGCG sobre a membrana plasmática e o estresse oxidativo, impossibilita afirmar se a catequina e a EGCG são terapias promissoras para a criopreservação do sêmen caprino.

## AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro, bem como à Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO).

## REFERÊNCIAS

- ADELA, P.; DUMITRIȚA, R.; RALUCA, P; CARMEN, S. Catechin-rich green tea extract modulates the oxidative status of human retinal pigment epithelial cells. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 15, n.1, p. 4964- 4978, 2010.
- ARTS, M.J.T.J.; HAENEN, G.R.M.M.; WILMS, L.C.; BEETSTRA, S.A.J.N.; HEIJNEN, C.G.M.; VOSS, H.-P.; BAST, A. Interactions between flavonoids and proteins: effect on the total antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 5, p. 1184-1187, 2002.
- BALDASSARRE, H.; KARATZAS, C.N. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 255-266, 2004.
- BANSAL, A.K.; BILASPURIG.S. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, p. 1-7, 2011.

BARBAS, J.P.; MASCARENHAS, R.D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell Tissue Bank**, v. 10, p. 49-62, 2009.

BASTIANETTO, S.; DUMONT, Y.; QUIRION, R. Catechins and resveratrol as protective polyphenols against beta-amyloid-induced toxicity: Possible significance to Alzheimer's disease. **Recent Advances on Nutrition and the Prevention of Alzheimer's Disease**, v. 37/661, n. 2, p. 145-154, 2010.

BOONSORN, T.; KONGBUNTAD, W.; NARKKONG, N.-A.; Aengwanich, W. Effects of catechin addition to extender on sperm quality and lipid peroxidation in boar semen. **American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 7, n. 3, p. 283-288, 2010.

CHOBOT, V.; HUBER, C.; TRETTEHNAHN, G.; HADACEK, F. ( $\pm$ )-Catechin: Chemical weapon, antioxidant, or stress regulator? **Journal of Chemical Ecology**, v. 35, p. 980-996, 2009.

CORDOBA, M.; MORA, N.; BECONI, M.T. Respiratory burst and NAD(P)H oxidase activity are involved in capacitation of cryopreserved bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 65, p. 882-892, 2006.

De AMICIS, F.; SANTORO, M.; GUIDO, C.; RUSSO, A.; AQUILA, S. Epigallocatechin gallate affects survival and metabolism of human sperm, **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 56, p. 1655-1664, 2012.

DORADO, J.; MUÑOZ-SERRANO, A.; HIDALGO, M. The effect of cryopreservation on goat semen characteristics related to sperm freezability. **Animal Reproduction Science**, v. 121, p. 115-123, 2010.

DULLOO, A.G.; DURET, C.; ROHRER, D.; GIRARDIER, L.; MENSI, N.; FATHI, M.; CHANTRE, P.; VANDERMANDER, J. Efficacy of a green tea extract rich in catechin polyphenols and caffeine in increasing 24-h energy expenditure and fat oxidation in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, p. 1040-1045, 1999.

FUJISAWA, S.; ISHIHARA, M.; ATSUMI, T.; KADOMA, Y. A Quantitative approach to the free radical interaction between alpha-tocopherol or ascorbate and flavonoids. **In Vivo**, v. 20, p. 445-452, 2006.

GU, J.-W.; MAKEY, K.L.; TUCKER, K.B.; CHINCHAR, E.; MAO, X.; PEI, I.; THOMAS, E.Y.; MIELE, L. EGCG, a major green tea catechin suppresses breast tumor angiogenesis and growth via inhibiting the activation of HIF-1 $\alpha$  and NF $\kappa$ B, and VEGF expression. **Vascular Cell**, v. 5, n. 9, p. 1-10, 2013.

HASSAN, Z.M.R.; DIN, H.M.F.E.; ALI, A.A.; MEHANNA, N.S.; EL-MESSERY, T.M. Interaction of some low molecular weight phenolics with milk proteins. **World Applied Sciences Journal**, v. 23, n. 2, p. 182-187, 2013.

HEO, H.J.; LEE, C.Y. Epicatechin and catechin in cocoa inhibit amyloid  $\beta$  protein induced apoptosis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n. 5, p. 1445-1448, 2005.

HIRASAWA, M.; TAKADA, K. Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 225-229, 2004.

JOYCE, C.L.; NUZZO, N.A.; WILSON Jr, L.; ZANEVELD, L.J.D. Evidence for a Role of Cyclooxygenase (Prostaglandin Synthetase) and Prostaglandins in the Sperm Acrosome Reaction and Fertilization. **Journal of Andrology**, v. 8, n. 2, p. 74-82, 1987.

KENNEDY, J.H.; KORN, N.; Thurston, R.J. Prostaglandin levels in seminal plasma and sperm extracts of the domestic turkey, and the effects of cyclooxygenase inhibitors on sperm mobility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 1-7, 2003.

KOPPERS, A.J.; De IULIIS, G.N.; FINNIE, J.M.; McLAUGHLIN, E.A.; AITKEN, R.J. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 93, p. 3199-3207, 2008.

KUNDU, J.K.; NA, H.-K.; CHUN, K.-S.; KIM, Y.-K.; LEE, S.J.; LEE, S.S.; LEE, O.-S.; SIM, Y.-C.; SURH, Y.-J. Inhibition of Phorbol Ester-Induced COX-2 Expression by Epigallocatechin Gallate in Mouse Skin and Cultured Human Mammary Epithelial Cells. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 11, p. 3805S-3810S, 2003.

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

LI, Y. **Antioxidants in biology and medicine: essentials, advances, and clinical applications**. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2011, 422 p.

LOTITO, S.B.; FRAGA, C.G. Catechins delay lipid oxidation and  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene depletion following ascorbate depletion in human plasma. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 225, n. 1, p. 32-38, 2000.

MABE, K.; YAMADA, M.; OGUNI, I.; TAKAHASHI, T. *In vitro* and *in vivo* activities of tea catechins against helicobacter pylori. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 7, p. 1788-1791, 1999.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, M.<sup>a</sup> J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, v. 17, n. 6, p. 271-278, 2002.

MATOS, D.L.; ARAÚJO, A.A.; ROBERTO, I.G.; TONIOLLI, R. Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 4, p. 225-232, 2008.

MORTIMER, S.T. CASA – Practical aspects. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 4, p. 515-524, 2000.

NAGAO, T.; KOMINE, Y.; SOGA, S.; MEGURO, S.; HASE, T.; TANAKA, Y.; TOKIMITSU, I. Ingestion of a tea rich in catechins leads to a reduction in body fat and malondialdehyde-modified LDL in men. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 122-129, 2005.

NATH, S.; BACHANI, M.; HARSHAVARDHANA, D.; STEINER, J.P. Catechins protect neurons against mitochondrial toxins and HIV proteins via activation of the BDNF pathway. **Journal for Neurovirology**, v. 18, n. 6, p. 445-55., 2012.

NOREEN, Y.; RINGBOM, T.; PERERA P.; DANIELSON, H.; BOHLIN, L. Development of a radiochemical cyclooxygenase-1 and -2 *in vitro* assay for identification of natural products as inhibitors of prostaglandin biosynthesis. *Journal of Natural Products*, v. 61, n. 1, p. 2-7, 1998.

OLIVEIRA, M.E.F.; TEIXEIRA, P.P.M.; VICENTE, W.R.R. **Biotécnicas reprodutivas em ovinos e caprinos**. 1<sup>a</sup> Ed. São Paulo: Med Vet, 2013. 305 p.

PURDY, P.H. ; ERICSSON, S.A.; DODSON, R.E.; STERNES, K.L.; GARNER, D.L. Effects of the flavonoids, silibinin and catechin, on the motility of extended cooled caprine sperm. **Small Ruminant Research**, v. 55, p. 239-243, 2004.

RAMIO-LLUCH, L.; FERNANDEZ-NOVELL, J.M.; PENA, A.; COLAS, C.; CEBRIAN-PEREZ, J.A.; MUINO-BLANCO, T.; RAMIREZ, A.; CONCHA, I.I.; RIGAU, T.; RODRIGUEZ-GIL, J.E. 'In vitro' capacitation and acrosome reaction are concomitant with specific changes in mitochondrial activity in boar sperm: evidence for a nucleated mitochondrial activation and for the existence of a capacitation-sensitive subpopulational structure. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 664-673, 2011.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II. Cause of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, v. 38, p. 1-36, 1995.

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.

SCHLACHTERMAN, A.; VALLE, F.; WALL, K.M.; AZIOS, N.G.; CASTILLO, L.; MORELL, L.; WASHINGTON, A.V.; CUBANO, L.A.; DHARMAWARDHANE, S.F. Combined Resveratrol, Quercetin, and Catechin Treatment Reduces Breast Tumor Growth in a Nude Mouse Model. **Translational Oncology**, v. 1, n. 1, p. 19-27, 2008.

SIKKA, S.C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 1, p. 5-18, 2004.

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

SILVA, S.V., SOARES, A.T., BATISTA, A.M., ALMEIDA, F.C., NUNES, J.F., PEIXOTO, C.A., GUERRA, M.M.P. 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.

SIMOS, Y.V.; VERGINADIS, I.I.; TOLIOPOULOS, I.K.; VELALOPOULOU, A.P.; KARAGOUNIS, I.V.; KARKABOUNAS, S.C.; M EVANGELOU, A.M. Effects of catechin and epicatechin on superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity, in vivo. **Redox Report**, v. 17, n. 5, p. 181-186, 2012.

SONG, J.-M.; LEE, K.-H.; SEONG, B.-L. Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. **Antiviral Research**, v. 68, p. 66-74, 2005.

VALLORANI, C.; SPINACI, M.; BUCCI, D.; TAMANINI, C.; GALEATI, G. Effects of antioxidants on boar spermatozoa during sorting and storage. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 1, p. 58-65, 2010.

WANG, Z.G.; YU, S.D.; XU, Z.R. Effect of supplementation of green tea polyphenols on the developmental competence of bovine oocytes in vitro. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 1079-1085, 2007.

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

WEINREB, O.; AMIT, T.; MANDEL, S.; YODIM, M.B.H. Neuroprotective molecular mechanisms of (-)-epigallocatechin-3-gallate: a reflective outcome of its antioxidant, iron chelating and neuritogenic properties. **Genes and Nutrition**, v. 4, p. 283-296, 2009.

WILLIAMSON, G.; MANACH, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. The **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 243S-255S, 2005.

ZAVERI, N.T. Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications. **Life Sciences**, v. 78, p. 2073-2080, 2006.

ZHENG, J.; RAMIREZ, V.D. Inhibition of mitochondrial proton F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, 1115-1123, 2000.

ZHU, Q.Y.; ZHANG, A.; TSANG, D.; HUANG, Y.; CHEN, Z. Stability of green tea catechins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 4624-4628, 1997.

**Tabela 1** - Parâmetros cinéticos (Média ± DP) de amostras seminais caprinas congeladas em diluidor à base de leite desnatado (7% glicerol), adicionado de diferentes concentrações de (+)-catequina (0, 15, 25, 50, 75 e 100 µM) e avaliadas 0 e 1 h após descongelação

	<b>C0</b>	<b>C15</b>	<b>C25</b>	<b>C50</b>	<b>C75</b>	<b>C100</b>
<b>Tempo 0 h</b>						
MT (%)	68,2±7,0	71,0±13,8	71,2±9,4	69,4±7,2	67,2±10,3	72,1±10,7
MP (%)	23,7±3,7	27,7±4,1	24,2±2,6	21,8±2,3	23,5±3,2	21,2±4,6
VCL (µm/s)	81,2±10,1	86,0±4,6	80,9±2,5	75,7±7,0	80,3±10,8	77,4±8,1
VSL (µm/s)	41,7±5,3 <sup>ab</sup>	45,4±5,3 <sup>a</sup>	41,5±3,7 <sup>ab</sup>	36,9±1,4 <sup>b</sup>	39,7±3,5 <sup>ab</sup>	35,2±3,1 <sup>b</sup>
VAP (µm/s)	55,4±7,2 <sup>ab</sup>	59,2±4,4 <sup>a</sup>	54,7±3,1 <sup>ab</sup>	49,3±2,6 <sup>b</sup>	52,2±6,3 <sup>ab</sup>	48,0±4,5 <sup>b</sup>
LIN (%)	51,4±2,9	52,9±7,0	51,3±3,9	49,2±5,1	49,9±4,7	45,6±2,2
STR (%)	75,3±2,5	76,7±6,4	75,9±2,8	75,0±4,5	76,4±4,6	73,4±3,0
WOB (%)	68,2±2,5 <sup>a</sup>	68,8±4,2 <sup>a</sup>	67,5±2,8 <sup>a</sup>	65,4±3,2 <sup>ab</sup>	65,2±2,3 <sup>ab</sup>	62,1±1,2 <sup>b</sup>
ALH (µm)	3,1±0,2	3,2±0,2	3,1±0,2	3,1±0,3	3,2±0,4	3,3±0,2
BCF (Hz)	11,1±0,8 <sup>a</sup>	11,4±0,6 <sup>ab</sup>	11,3±0,4 <sup>ab</sup>	11,7±0,5 <sup>ab</sup>	12,4±0,5 <sup>b</sup>	12,2±0,8 <sup>b</sup>
<b>Tempo 1 h</b>						
MT (%)	59,5±11,5	54,3±15,8	56,0±14,6	57,9±8,6	57,1±14,4	56,0±15,1
MP (%)	25,1±3,6	23,3±9,6	21,8±5,5	23,1±8,8	23,3±6,4	21,0±12,2
VCL (µm/s)	78,1±7,5	80,4±15,2	77,1±13,1	76,8±14,6	79,0±11,4	73,8±12,2
VSL (µm/s)	42,4±4,0	43,2±6,1	41,5±7,2	40,4±8,0	41,3±2,4	38,0±8,8
VAP (µm/s)	52,2±4,6	53,8±9,2	52,4±9,1	50,5±9,9	51,4±5,2	47,6±9,4
LIN (%)	54,5±5,0	54,1±4,2	54,2±7,2	53,0±6,8	52,8±4,9	51,2±5,8
STR (%)	81,2±3,4	80,6±3,6	79,3±5,0	80,2±6,0	80,8±4,1	79,6±6,3
WOB (%)	67,0±3,9	67,1±3,3	68,1±5,7	65,9±4,7	65,3±3,4	64,2±3,0
ALH (µm)	3,2±0,2	3,2±0,4	3,1±0,4	3,1±0,5	3,2±0,3	3,2±0,3
BCF (Hz)	13,0±1,0	12,8±1,2	12,5±0,8	13,2±0,9	13,1±1,1	13,4±1,3

Letras diferentes na mesma linha demonstram diferença entre os grupos (P<0,05). MT: motilidade total; MP: motilidade progressiva; VCL: velocidade curvilínea; VSL: velocidade linear progressiva; VAP: velocidade média da trajetória; LIN: linearidade; STR: retilinearidade; WOB: oscilação; ALH: amplitude de deslocamento lateral de cabeça; BCF: frequência de batimento flagelar cruzado.

**Tabela 2** - Parâmetros cinéticos (Média ± DP) de amostras seminais caprinas congeladas em diluidor à base de leite desnatado (7% glicerol), adicionado de diferentes concentrações de EGCG (0, 15, 25, 50, 75 e 100 µM) e avaliadas 0 e 1 h após descongelação

	<b>E0</b>	<b>E15</b>	<b>E25</b>	<b>E50</b>	<b>E75</b>	<b>E100</b>
<b>Tempo 0 h</b>						
MT (%)	68,8±9,0	66,4±11,5	67,4±11,8	60,0±11,0	59,7±10,7	69,1±8,3
MP (%)	27,1±2,6 <sup>a</sup>	27,22±4,3 <sup>a</sup>	24,4±2,6 <sup>ab</sup>	19,4±2,8 <sup>b</sup>	19,9±2,0 <sup>b</sup>	24,6±6,6 <sup>ab</sup>
VCL (µm/s)	80,4±14,6	84,3±9,6	81,0±7,7	78,1±11,7	82,7±9,4	84,1±6,7
VSL (µm/s)	43,9±6,1	45,8±5,9	41,8±3,7	38,3±6,1	39,6±6,2	39,6±5,4
VAP (µm/s)	56,1±9,0	58,6±7,7	55,1±5,8	50,8±8,6	53,3±7,5	53,5±4,9
LIN (%)	55,1±5,2 <sup>a</sup>	54,4±3,5 <sup>ab</sup>	51,7±3,2 <sup>ab</sup>	49,1±3,2 <sup>ab</sup>	47,8±3,7 <sup>ab</sup>	47,1±5,9 <sup>b</sup>
STR (%)	78,7±4,2	78,5±3,8	76,1±4,2	75,5±3,8	74,3±3,4	73,8±4,7
WOB (%)	70,0±3,1	69,2±2,0	67,9±1,6	65,0±2,3	64,3±2,5	63,7±3,8
ALH (µm)	3,0±0,4	3,0±0,2	3,1±0,2	3,3±0,2	3,2±0,1	3,2±0,3
BCF (Hz)	11,5±0,9	12,2±1,0	12,1±0,7	12,1±1,0	12,2±0,8	12,4±0,6
<b>Tempo 1 h</b>						
MT (%)	59,5±7,4	49,8±16,1	51,3±7,3	57,6±15,2	55,4±19,5	54,4±17,4
MP (%)	24,2±9,1	19,7±6,2	18,4±3,6	19,7±6,3	21,1±7,4	19,8±5,9
VCL (µm/s)	75,6±12,2	71,3±6,3	68,7±5,9	72,4±13,7	75,1±9,8	78,0±12,8
VSL (µm/s)	42,0±12,8	38,5±6,2	35,9±3,3	35,8±4,6	38,8±6,0	39,0±4,5
VAP (µm/s)	52,0±12,1	47,0±5,0	45,3±2,9	45,9±7,4	48,6±6,2	49,9±7,0
LIN (%)	54,6±8,6	54,1±7,9	52,4±5,4	50,1±5,3	51,8±7,1	50,6±5,5
STR (%)	79,7±6,2	81,5±6,0	79,2±5,1	78,4±4,1	79,6±5,4	78,6±5,7
WOB (%)	68,2±5,8	66,0±5,4	66,1±2,8	63,8±3,5	64,9±4,8	64,3±2,3
ALH (µm)	3,0±0,2	3,0±0,3	3,1±0,3	3,1±0,4	3,0±0,4	3,2±0,3
BCF (Hz)	12,5±1,3	13,1±0,8	12,4±0,9	13,1±0,6	13,0±1,0	13,4±0,7

Letras diferentes na mesma linha demonstram diferença entre os grupos (P<0,05). MT: motilidade total; MP: motilidade progressiva; VCL: velocidade curvilínea; VSL: velocidade linear progressiva; VAP: velocidade média da trajetória; LIN: linearidade; STR: retilinearidade; WOB: oscilação; ALH: amplitude de deslocamento lateral de cabeça; BCF: frequência de batimento flagelar cruzado.



**Tabela 3** - Integridade de membrana plasmática e acrossomal, morfologia normal e estresse oxidativo negativo (Média  $\pm$  DP) de amostras de sêmen caprino congeladas em diluidor à base de leite desnatado (7% glicerol), adicionado de diferentes concentrações de (+)-catequina (0, 15, 25, 50, 75 e 100  $\mu$ M) e avaliadas nos tempos 0 e 1 h após descongelação

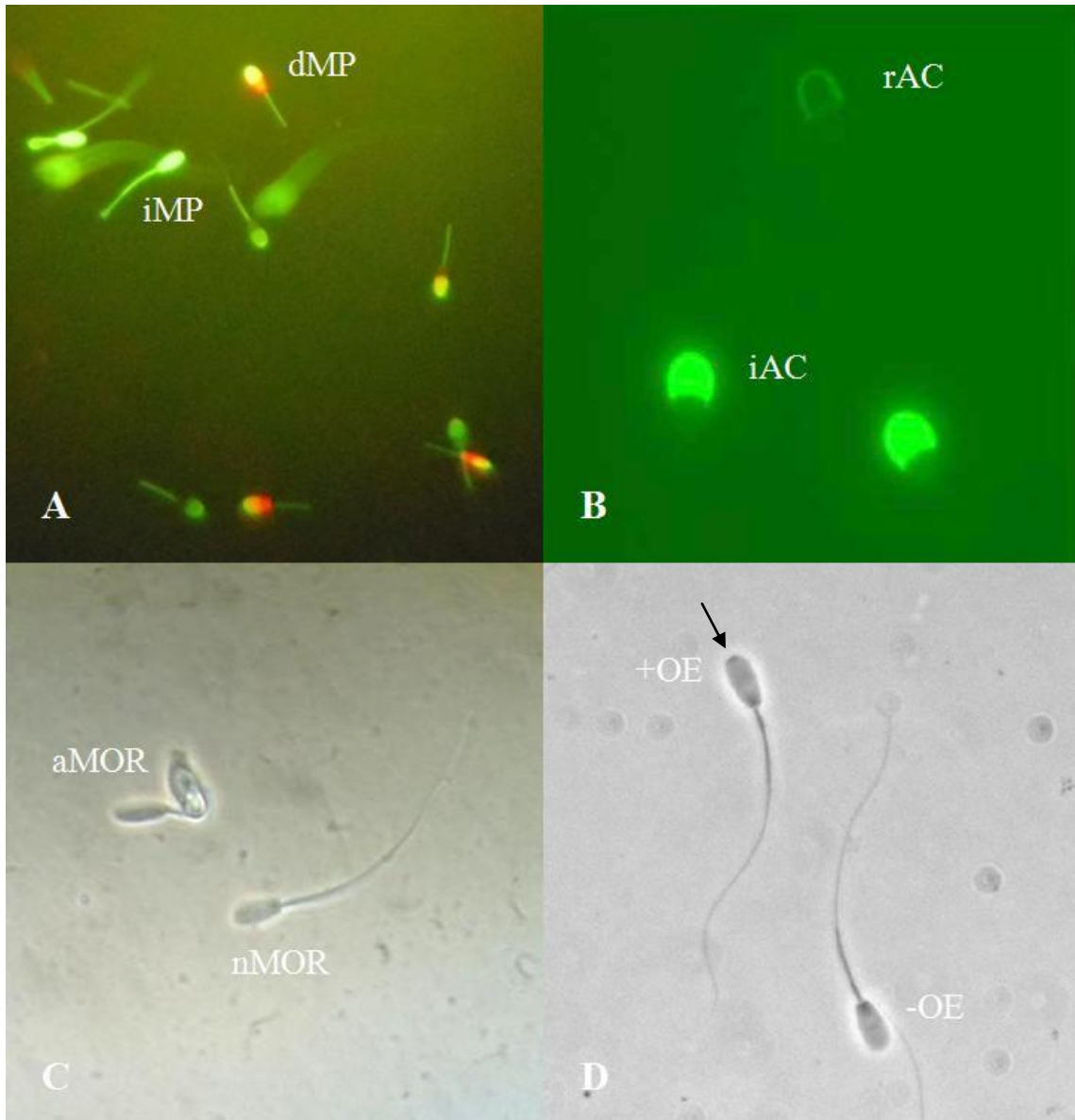
	<b>C0</b>	<b>C15</b>	<b>C25</b>	<b>C50</b>	<b>C75</b>	<b>C100</b>
<b>Time 0 h</b>						
iMP (%)	39,6 $\pm$ 6,5	44,6 $\pm$ 5,6	47,4 $\pm$ 8,4	43,5 $\pm$ 7,2	48,0 $\pm$ 7,8	47,1 $\pm$ 4,0
iAC (%)	50,9 $\pm$ 9,3	48,3 $\pm$ 4,3	48,8 $\pm$ 4,3	53,2 $\pm$ 10,1	52,5 $\pm$ 5,5	49,7 $\pm$ 9,0
nMOR (%)	79,9 $\pm$ 3,2	79,6 $\pm$ 3,8	78,4 $\pm$ 2,5	75,8 $\pm$ 4,9	78,3 $\pm$ 4,0	77,0 $\pm$ 2,7
-OE (%)	78,8 $\pm$ 4,0	81,2 $\pm$ 4,9	82,5 $\pm$ 3,5	83,0 $\pm$ 3,4	82,3 $\pm$ 6,5	82,3 $\pm$ 4,3
<b>Time 1 h</b>						
iMP (%)	28,1 $\pm$ 6,7	32,8 $\pm$ 8,7	34,0 $\pm$ 7,3	33,4 $\pm$ 5,6	37,2 $\pm$ 12,2	33,6 $\pm$ 7,4
iAC (%)	51,5 $\pm$ 14,9	48,5 $\pm$ 10,6	44,3 $\pm$ 10,9	50,8 $\pm$ 13,8	46,6 $\pm$ 7,2	48,9 $\pm$ 7,3
nMOR (%)	76,3 $\pm$ 8,4	74,9 $\pm$ 3,1	73,5 $\pm$ 2,6	76,6 $\pm$ 5,3	70,8 $\pm$ 5,4	75,2 $\pm$ 1,8
-OE (%)	76,3 $\pm$ 4,8	76,5 $\pm$ 3,3	75,2 $\pm$ 5,1	78,8 $\pm$ 4,1	77,0 $\pm$ 4,5	80,2 $\pm$ 5,9

iMP: integridade de membrana plasmática; iAC: integridade de acrossoma; nMOR: morfologia normal; -EO: estresse oxidativo negativo.

**Tabela 4** - Integridade de membrana plasmática e acrossomal, morfologia normal e estresse oxidativo negativo (Média  $\pm$  DP) de amostras de sêmen caprino congeladas em diluidor à base de leite desnatado (7% glicerol), adicionado de diferentes concentrações de EGCG (0, 15, 25, 50, 75 e 100  $\mu$ M) e avaliadas nos tempos 0 e 1 h após descongelação

	<b>E0</b>	<b>E15</b>	<b>E25</b>	<b>E50</b>	<b>E75</b>	<b>E100</b>
<b>Time 0h</b>						
iMP (%)	39,3 $\pm$ 4,7	44,5 $\pm$ 6,8	41,0 $\pm$ 5,5	43,5 $\pm$ 8,2	43,3 $\pm$ 4,2	51,3 $\pm$ 8,3
iAC (%)	44,8 $\pm$ 7,0	45,1 $\pm$ 8,1	47,0 $\pm$ 10,5	46,0 $\pm$ 6,6	47,8 $\pm$ 4,9	49,7 $\pm$ 7,6
nMOR (%)	79,9 $\pm$ 3,2	79,6 $\pm$ 3,8	78,4 $\pm$ 2,5	75,8 $\pm$ 4,9	78,3 $\pm$ 4,0	77,0 $\pm$ 2,7
-OE (%)	78,5 $\pm$ 3,5	81,0 $\pm$ 4,4	82,3 $\pm$ 2,8	82,7 $\pm$ 4,6	81,3 $\pm$ 4,0	82,0 $\pm$ 2,9
<b>Time 1h</b>						
iMP (%)	37,6 $\pm$ 6,6	34,8 $\pm$ 10,0	36,1 $\pm$ 9,9	31,5 $\pm$ 13,0	31,6 $\pm$ 7,2	33,0 $\pm$ 5,0
iAC (%)	43,4 $\pm$ 8,8	42,7 $\pm$ 11,8	39,6 $\pm$ 9,7	42,1 $\pm$ 10,2	40,0 $\pm$ 11,0	42,1 $\pm$ 9,8
nMOR (%)	76,3 $\pm$ 8,4	74,9 $\pm$ 3,1	73,5 $\pm$ 2,6	76,6 $\pm$ 5,3	70,8 $\pm$ 5,4	75,2 $\pm$ 1,8
-OE (%)	74,0 $\pm$ 2,9	76,0 $\pm$ 4,6	78,7 $\pm$ 4,7	78,0 $\pm$ 3,9	78,8 $\pm$ 2,2	77,2 $\pm$ 2,9

iMP: integridade de membrana plasmática; iAC: integridade de acrossoma; nMOR: morfologia normal; -EO: estresse oxidativo negativo.



**Figura 1** - Análise microscópica dos espermatozoides. (A) Integridade da membrana plasmática: membrana plasmática íntegra (iMP) e danificada (dMP); (B) Integridade de acrossoma: acrossoma intacto (iAC) e reagido (rAC); (C) Morfologia espermática: espermatozoide morfologicamente normal (nMOR) e anormal (aMOR); (D) Estresse oxidativo: espermatozoide não portador de estresse oxidativo (-EO) e portador de estresse oxidativo (+EO).

## 4.2 Efeito do resveratrol ou da quercetina sobre a congelabilidade de espermatozoides caprinos

*Effect of resveratrol or quercetin on freezability of goat semen*

Ellen Cordeiro Bento da Silva<sup>a</sup>, Lúcia Cristina Pereira Arruda<sup>a</sup>, José Adalberto Caetano de Lima Filho<sup>a</sup>, Chirlane Castro da Silva<sup>b</sup>, Maria Madalena Pessoa Guerra<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Andrologia, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 52.171-900, Pernambuco, Brasil

<sup>b</sup>Laboratório de animais peçonhentos e toxinas, Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 50670-901, Pernambuco, Brasil

### RESUMO

Foi objetivado neste estudo avaliar o efeito de diferentes concentrações de trans-resveratrol ou quercetina sobre a congelabilidade dos espermatozoides da espécie caprina. Seis *pools* de sêmen obtidos de seis bodes foram processados de acordo com os experimentos ou grupos experimentais (Experimento 1: 0, 15, 25, 50, 75 ou 100 µM de resveratrol; Experimento 2: 0, 15, 25, 50, 75 ou 100 µM de quercetina) e congelados. Após descongelação, o sêmen foi avaliado quanto à cinética espermática, integridade de membrana plasmática e acrossomal, morfologia e estresse oxidativo, nos tempos 0 e 1 h de incubação. Imediatamente após descongelação (0 h), a WOB (oscilação) dos grupos 0 e 25 µM de resveratrol e 0 µM de quercetina foi superior ( $P < 0,05$ ) a do grupo 100 µM de cada antioxidante, respectivamente. Para os demais parâmetros e tempos de avaliação não foi observada diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os grupos experimentais, em ambos os experimentos. Assim, pode-se concluir que o resveratrol e a quercetina não têm qualquer influência sobre a congelabilidade do sêmen caprino, não sendo justificável o uso destes como promotores da melhoria na qualidade dos espermatozoides caprinos congelados-descongelados.

**Palavras-chaves:** antioxidantes; flavonoide; não flavonoide; congelação de sêmen; estresse oxidativo.

## ABSTRACT

It was aimed in this study to evaluate the effect of different concentrations of trans-resveratrol or quercetin on the freezability of goat sperm. Six *pools* of semen obtained from six male goats were processed according to experiments and experimental groups (Experiment 1: 0, 15, 25, 50, 75 or 100  $\mu\text{M}$  resveratrol; Experiment 2: 0, 15, 25, 50, 75 or 100  $\mu\text{M}$  quercetin) and frozen. After thawing, semen was evaluated for sperm kinematics, plasma membrane and acrosome integrity, morphology and oxidative stress, at 0 and 1 h of incubation. Immediately after thawing (0 h), WOB (wobble) in the groups 0 and 25  $\mu\text{M}$  resveratrol and 0  $\mu\text{M}$  quercetin was higher ( $P < 0.05$ ) than in the 100  $\mu\text{M}$  from each antioxidant, respectively. To the other parameters and times of evaluation, not were observed significant difference ( $P > 0.05$ ) among the experimental groups, in both experiments. Thus, it can be concluded that resveratrol and quercetin do not have any influence on the freezability of goat semen, fact that not justify their use as a promoter of improvement on frozen-thawed goat spermatozoa quality.

**Keywords:** antioxidant; flavonoid; no flavonoid; semen freezing; oxidative stress

## INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA), em associação ao uso do sêmen criopreservado, tem importante papel nas criações de caprinos, por possibilitar a intensificação dos sistemas de produção e o melhoramento genético dos rebanhos (LEBOEUF et al., 2000; NUNES, 2010). Em contrapartida, a criopreservação do sêmen, com destaque para o processo de congelamento, provoca danos estruturais e funcionais aos espermatozoides, com consequente comprometimento da fertilidade (LEBOEUF et al., 2000; ABOAGLA e TERADA, 2003).

Dentre os fatores responsáveis pela geração das crioinjúrias, durante o processo de criopreservação, destaca-se o estresse oxidativo (ZRIBI et al., 2012). Este resulta do desequilíbrio entre a produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) e os sistemas de defesa antioxidantes do sêmen (TURNER e LYSLAK, 2008; ZINI e AL-HATHAL, 2011; RANAWAT et al., 2013) e é responsável pelo comprometimento da função e da viabilidade espermática (De LAMIRANDE et al., 1997; RANAWAT et al., 2013). Por conseguinte, o uso de terapias antioxidantes, durante o processamento do sêmen, tem por finalidade combater os danos oxidativos gerados (AGARWAL et al., 2005).

Neste contexto, o trans-resveratrol e a quercetina chamam a atenção por seus elevados potenciais antioxidantes (SARLÓS et al., 2002; ZRIBI et al., 2012). O trans-resveratrol é um composto fenólico não flavonoide, pertencente à família dos estilbenos (VACCARI et al., 2009; PLANAS et al., 2011), enquanto a quercetina é um flavonoide aglicona da subclasse dos flavonóis (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004; KELLY, 2011). Ambos agentes fitoquímicos são encontrados em plantas e produtos derivados (PLANAS et al., 2011; DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004; KELLY, 2011).

O trans-resveratrol e a quercetina apresentam papel de destaque na proteção contra enfermidades como o câncer (STERVBO et al., 2006; LI et al., 2011; WANG et al., 2011) e as doenças cardiovasculares (EDWARDS et al., 2007; PETROVSKI et al., 2011). Entretanto, apesar de serem descritos como antioxidantes mais potentes do que as vitaminas C e E (STOJANOVIĆ et al., 2001), seus efeitos sobre o sêmen ainda são variados e inconclusivos (SILVA e GUERRA, 2012). Com base no exposto e na necessidade de desenvolver um diluidor de congelamento apropriado para espermatozoides caprinos, foi objetivado neste estudo avaliar o efeito de diferentes concentrações de trans-resveratrol ou de quercetina, sobre a congelabilidade dos espermatozoides desta espécie.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Salvo quando especificado no texto, todos os reagentes utilizados neste estudo foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St Louis, MO, USA).

### **Animais e local do estudo**

O estudo em questão foi aprovado pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE - Brasil), sob o número de processo CEEUA/UFRPE 014/2012. Seis reprodutores caprinos sexualmente maduros e com fertilidade comprovada (três Saanen, dois Toggenburg e um Alpino Britânico), com idades entre um e quatro anos, foram utilizados. Os animais foram criados na UFRPE, Pernambuco, Brasil (08° 03' 14'' S; 34° 52' 52'' W) e alimentados com feno de tifton e concentrado, além de água e sal mineral *ad libitum*.

## Colheita de sêmen

A colheita de sêmen foi realizada pelo método da vagina artificial, com uma fêmea como manequim, em intervalos de 48 h, totalizando 36 ejaculados por experimento; seis de cada reprodutor. Amostras de sêmen *in natura* foram subjetivamente examinadas quanto ao turbilhonamento (0-5), motilidade (0-100%) e vigor (0-5) em microscópio óptico de contraste de fase (Olympus, Tóquio, Japão; 100 X), além de concentração espermática em câmara de Neubauer (400 X) e morfologia espermática em câmara úmida (1000 X), após diluição em formol citrato (1:400; v:v). Os ejaculados aprovados (turbilhonamento  $\geq 3$ , motilidade  $\geq 70\%$ , vigor  $\geq 3$ , concentração  $\geq 2 \times 10^9$  espermatozoides/mL e alterações morfológicas totais  $\leq 20\%$ ) foram destinados à formação do *pool* seminal, totalizando seis *pools* por experimento.

## Processamento do sêmen para a congelação

Cada um dos seis *pool* de sêmen foi diluído em tampão Tris [3,605 g Tris-hidroximetil aminometano (T1378), 2,024 g ácido cítrico (C2404), 1,488 g frutose (F3510) e 100 mL água Milli-Q, pH 6,8; 1:9 (v:v)] e centrifugado (250 X g / 10 min) duas vezes, para a remoção do plasma seminal. Em seguida, o sêmen foi fracionado em seis alíquotas e estas foram diluídas em meio à base de leite desnatado [10 g leite desnatado em pó, 194 mg D-(+)-glucose (G6152), 100 mL água Milli-Q, 7% glicerol (G2025), pH 6,8] adicionado ou não de resveratrol ou quercetina, de acordo com os experimentos e grupos experimentais [Experimento 1: 0, 15, 25, 50, 75 ou 100  $\mu\text{M}$  de resveratrol (R5010); Experimento 2: 0, 15, 25, 50, 75 ou 100  $\mu\text{M}$  de quercetina (Q4951)]. O sêmen diluído para a concentração de  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL foi envasado em palhetas (0,25 mL) e congelado em sistema automático (TK-3000<sup>®</sup>, TK Tecnologia em Congelamento Ltda, Uberaba, Brasil), utilizando curva lenta específica para sêmen caprino. A queda de temperatura foi de 0,25 °C por min até atingir 5 °C, temperatura na qual as amostras foram mantidas por 120 min (tempo de estabilização). Em seguida foi iniciada a curva de congelação, com queda de 20 °C por min até atingir a temperatura de -120 °C. As palhetas foram então imersas e armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C) até a descongelação. As soluções estoque (10 mM) de resveratrol e de quercetina foram preparadas em DMSO (D4540) e armazenadas a -20 °C.

## Descongelamento e avaliação do sêmen

Após intervalo mínimo de 24 h da congelamento, foram descongeladas (37 °C / 30 s) quatro palhetas por grupo experimental. O sêmen foi incubado a 34 °C e alíquotas foram analisadas nos tempos 0 e 1 h após descongelamento, conforme descrito abaixo. Este processo foi realizado seis vezes para cada experimento e grupo experimental (n=6).

### Cinética espermática

Alíquotas de sêmen de cada grupo experimental foram diluídas (1:4; v:v) com o mesmo diluidor à base de leite desnatado utilizado no processo de congelamento. Tal procedimento foi realizado com o propósito de reduzir a concentração espermática para próximo de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL e facilitar a captura das imagens, sem sobreposições de espermatozoides (MORTIMER, 2000). Para realização da análise, uma alíquota de sêmen (5  $\mu$ L) foi depositada sobre uma lâmina previamente aquecida (37 °C) e coberta com lamínula. Em seguida, esta foi analisada em um microscópio de contraste de fase (100 X; Nikon<sup>TM</sup> H5505, Eclipse 50i, Tóquio, Japão) e as imagens capturadas utilizando uma câmera de vídeo (Basler Vision Technologie<sup>TM</sup> A312FC, Ahrensburg, Alemanha). Foram analisados cinco campos não consecutivos e selecionados aleatoriamente por amostra, com registro de, no mínimo, 2000 espermatozoides. Os parâmetros analisados utilizando o Sperm Class Analyzer - SCA<sup>TM</sup> software v. 5.1 (Microptics, S.L., Barcelona, Spain) foram: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR) e oscilação (WOB), expressos em valores percentuais; velocidade curvilínea (VCL), velocidade linear progressiva (VSL) e velocidade média da trajetória (VAP), expressas em micrometros por segundo; amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), expresso em micrometros; e frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), expresso em hertz.

### Integridade de membrana plasmática

A integridade da membrana plasmática foi determinada pelo método de coloração dupla com diacetato de carboxifluoresceína (DCF; C5041) e iodeto de propídio (IP; P4170), segundo SILVA et al. (2011). Alíquotas (50  $\mu$ L) de sêmen foram diluídas em 150



$\mu\text{L}$  de solução Tris, contendo 5  $\mu\text{L}$  DCF (0.46 mg/mL em DMSO) e 20  $\mu\text{L}$  IP (0.5 mg/mL em PBS), incubadas por 10 min a 37 °C e fixadas com PBS contendo 0,5% de glutaraldeído. Um total de 200 células por lâmina foi analisado em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha; 400 X), usando filtros DBP 485/20 nm para excitação e DBP 580 a 630-nm para emissão. Espermatozoides fluorescendo em verde e vermelho foram interpretados como portadores de membrana plasmática intacta e danificada, respectivamente.

#### Integridade de acrossoma

Para a determinação da integridade do acrossoma foi utilizada a sonda isotiocianato de fluoresceína conjugado a *Peanut agglutinin* (FITC-PNA; L7381) (SILVA et al., 2012). Estiraços foram preparados com alíquotas (10  $\mu\text{L}$ ) de sêmen, os quais foram secos a temperatura ambiente e armazenados a 4 °C. Para a análise, uma alíquota (30  $\mu\text{L}$ ) da solução de trabalho de FITC-PNA (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em PBS) foi depositada sobre a lâmina, a qual foi incubada em câmara úmida a 4 °C por 20 min, lavada em PBS e seca no escuro. Imediatamente antes da avaliação, 5  $\mu\text{L}$  de meio de montagem [4,5 mL glicerol, 0,5 mL PBS, 5 mg azida sódica (S8032) e 5 mg p-phenylenediamine (P6001)] foi depositado sobre o estiraço e coberto com lamínula. Um total de 200 espermatozoides foi examinado por lâmina, usando filtros LP 515-nm para emissão e 450-490 BP nm para excitação, em um microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha; 1000 X). Os espermatozoides foram classificados como portadores de acrossoma intacto, quando apresentavam a região acrossomal corada em verde fluorescente, ou de acrossoma reagido, quando apresentavam fluorescência apenas na região equatorial da cabeça ou quando não corados em verde fluorescente.

#### Morfologia

Para a análise da morfologia espermática foi empregado o método da câmara úmida (OLIVEIRA et al., 2013). Uma alíquota de sêmen foi diluída em solução de formol citrato (1:5; v:v) e 10  $\mu\text{L}$  desta solução foram depositados sobre uma lâmina, coberta com lamínula e vedada. Um total de 200 células foi analisado por lâmina, utilizando-se um

microscópio de contraste de fase (Olympus, Tóquio, Japão; 1000 X), e classificadas como morfológicamente normais ou patológicas.

### Estresse oxidativo

O estudo do estresse oxidativo dos espermatozoides caprinos foi realizado pelo teste *nitroblue tetrazolium* (NBT; N6639), conforme descrito por SALEH e AGARWAL (2002). Amostras de sêmen foram diluídas (1:1; v:v) em solução de NBT (0,1% em PBS), incubadas por 30 min a 37 °C e por mais 30 min à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (250 X g / 5 min) e os pellets ressuspensos em solução Tris. Alíquotas (10 µL) deste material foram utilizadas para a formação dos estiraços, os quais foram secos ao ar. Um total de 100 espermatozoides por lâmina foi analisado, para o que foi utilizado um microscópio de contraste de fase (Olympus, Tóquio, Japão; 1000 X). Os gametas foram classificados como estresse oxidativo positivo, quando havia depósito de formazana na região da cabeça ou peça intermediária, ou estresse oxidativo negativo, quando o depósito de formazana era ausente.

### Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias e desvios padrão (médias  $\pm$  DP). Antes da realização das análises, os dados percentuais de cinética espermática, integridade de membrana plasmática e de acrossoma, espermatozoides morfológicamente normais e de estresse oxidativo negativa, de cada experimento e tempo avaliado, foram transformados pelo arco seno. As comparações entre os tratamentos foram feitas com one-way ANOVA, seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer (INSTAT para Windows, versão 3.01) para detectar diferenças entre os grupos experimentais de cada experimento. Em todas as análises, os valores foram considerados significativos para  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

Após análise da cinética do sêmen caprino congelado-descongelado com diferentes concentrações de resveratrol ou de quercetina, observou-se que apenas o percentual de WOB dos grupos tratados com 0 µM e 25 µM de resveratrol ou 0 µM de quercetina foi

maior ( $P < 0,05$ ) do que o do grupo 100  $\mu\text{M}$  de resveratrol (Experimento 1; Tabela 1) ou de quercetina (Experimento 2; Tabela 2). Não foi observada diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os grupos experimentais para os demais parâmetros cinéticos analisados no tempo 0 h, bem como para todos eles 1 h após descongelação, em ambos os experimentos (Tabela 1 e 2).

Diferenças significativas também não foram observadas ( $P > 0,05$ ) para a integridade de membrana plasmática (Figura 1A), integridade de acrossoma (Figura 1B), porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais (Figura 1C) e de gametas sem estresse oxidativo (Figura 1D), entre os grupos experimentais. Tal fato ocorreu nos Experimentos 1 (Tabela 3) e 2 (Tabela 4), para os tempos de avaliação 0 e 1 h após descongelação.

## DISCUSSÃO

À exceção da WOB no tempo 0 h, o tratamento do sêmen caprino com diferentes concentrações (0, 15, 25, 50, 75 e 100  $\mu\text{M}$ ) de trans-resveratrol ou de quercetina não alterou a cinética espermática. Além disso, a WOB não é correlacionada com a função e capacidade fertilizante dos espermatozoides. Assim, os achados em questão corroboram com os de SILVA et al. (2012) para sêmen congelado de ovino (21,9; 43,8; 65,7 e 87,6  $\mu\text{M}$ ) e com os de MARTIN-HIDALGO et al. (2013) para sêmen refrigerado de suíno (10 e 33  $\mu\text{M}$ ) com resveratrol. O mesmo se repete para a quercetina, em relação a estudos com espermatozoides incubados de humanos em concentrações inferiores a 400  $\mu\text{M}$  (MAZZI et al., 2011; MORETTI et al., 2012) e de macacos (10, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ) (LI et al., 1997), bem como, com espermatozoides ovinos congelados (21,9; 43,8; 65,7 e 87,6  $\mu\text{M}$ ) (SILVA et al., 2012).

Entretanto, há relatos sobre o efeito inibidor do resveratrol e da quercetina sobre a cinética espermática de diferentes espécies, em particular quando utilizados em concentrações elevadas (BREITBART et al., 1985; WILLIAMS e FORD, 2003; GARCEZ et al., 2010; MORETTI et al., 2012; MARTIN-HIDALGO et al., 2013). As divergências entre estudos com o uso desses polifenóis têm sido relacionadas com a dose e espécie trabalhada (MAZZI et al., 2011; MORETTI et al., 2012; MARTIN-HIDALGO et al., 2013). De acordo com a espécie, enzimas ligadas direta ou indiretamente à manutenção da motilidade espermática, tais como a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (NASS-ARDEN e BREITBART, 1990; KHANDUJA et al., 2001), F0F1-ATPase (ZHENG e RAMIREZ, 2000) e cicloxigenase

(COX) (KENNEDY et al., 2003; KOWALSKA et al., 2011), são inibidas em graus variados.

Assim como evidenciado no presente estudo, os parâmetros de integridade de membrana plasmática e de acrossoma, bem como de morfologia espermática, não foram alterados em espermatozoides de diferentes espécies e submetida a diferentes processamentos na presença de resveratrol (BRANCO et al., 2010; SILVA et al., 2012; MARTIN-HIDALGO et al., 2013) ou de quercetina (SATORRE e CÓRDOBA, 2010; SILVA et al., 2012; GIBB et al., 2013). Contudo, alguns estudos relatam o efeito benéfico deste último sobre os parâmetros seminais em questão, o que pode ser relacionado ao seu caráter lipofílico (KELLY, 2011; CARRASCO-POZO et al., 2012) e nucleofílico (GIBB et al., 2013). Apesar disso, a quercetina pode tornar-se prejudicial quando em altas concentrações e a depender da espécie envolvida (KHANDUJA et al., 2001; MAZZI et al., 2011; MORETTI et al., 2012).

O estresse oxidativo do sêmen caprino congelado-descongelado não foi reduzido após tratamento com resveratrol ou quercetina. Contudo, a adição de resveratrol (SARLÓS et al., 2002; FEDERICO et al., 2009; GARCEZ et al., 2010; COLLODEL et al., 2011) e de quercetina (NASS-ARDEN e BREITBART, 1990; McNIVEN e RICHARDSON, 2003; MAZZI et al., 2011; MORETTI et al., 2012) ao sêmen de diferentes espécies é relacionada com a prevenção de danos oxidativos. Porém, na maioria dos estudos, a redução da lipoperoxidação por estes compostos fenólicos foi constatada após indução da oxidação. Deste modo, é provável que o efeito protetor destes antioxidantes torne-se visível apenas em situações de estresse extremo, embora estas não necessariamente reflitam às condições fisiológicas as quais o sêmen é exposto.

A cinética espermática (MORTIMER, 2000; HOLT et al., 2007) e a integridade de membrana plasmática (LENZI et al., 1996; SILVA e GADELLA, 2006) e acrossomal (ESTEVEZ et al., 2000; SILVA e GADELLA, 2006) são parâmetros fundamentais à manutenção da capacidade fertilizante dos espermatozoides. Deste modo, com base nos resultados do presente estudo, o uso do resveratrol ou da quercetina tornou-se injustificável durante a congelação do sêmen caprino, visto que não melhoraram os parâmetros espermáticos avaliados. Apesar disso, nenhum efeito deletério foi observado sobre os gametas, sendo possível que após indução da oxidação, a exemplo de estudos anteriormente descritos para outras espécies (SARLÓS et al., 2002; GARCEZ et al., 2010;

McNIVEN e RICHARDSON, 2003; MORETTI et al., 2012), estes polifenóis manifestem ação protetora.

Com base no exposto, em virtude da variabilidade espécie-específica a ação do resveratrol e da quercetina, assim como da inexistência de estudos anteriores com o uso destes agentes em espermatozoides caprinos, é necessária à realização de novas investigações envolvendo este tipo celular. Para tanto, devem ser esclarecidos os mecanismos de ação destes antioxidantes sobre os espermatozoides da espécie caprina, além de correlacionar tais mecanismos com a atividade enzimática e com a manutenção da fisiologia espermática. Adicionalmente, estudos *in vivo* devem ser realizados, a partir do que a terapia com resveratrol ou quercetina poderá tornar-se válida para as práticas reprodutivas em medicina veterinária, na qual a IA é a biotécnica reprodutiva mais disseminada (OLIVEIRA et al.,2013).

## **CONCLUSÃO**

Com base nos resultados apresentados neste estudo, pode-se concluir que o resveratrol e a quercetina não têm qualquer influência sobre a congelabilidade do sêmen caprino, não sendo justificável o uso destes agentes como promotores da melhoria da qualidade dos espermatozoides caprinos congelados-descongelados.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores são gratos à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro, bem como à Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO).

## **REFERÊNCIAS**

ABOAGLA, E.M.-E.; TERADA, T. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1245-1250, 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.

BRANCO, C.S.; GARCEZ, M.E.; PASQUALOTTO, F.F.; ERDTMAN, B.; SALVADOR, M. Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. **Cryobiology**, v. 60, p. 235–237, 2010.

BREITBART, H.; RUBINSTEINAN, S.; NASS-ARDEN, L. The role of calcium and Ca<sup>2+</sup>-ATPase in maintaining motility in ram spermatozoa. **The Journal of Biological Chemistry**, n.260, n. 21, p. 11548-11553, 1985.

CARRASCO-POZO, C.; MIZGIER, M.L.; SPEISKY, H.; GOTTELAND, M. Differential protective effects of quercetin, resveratrol, rutin and epigallocatechin gallate against mitochondrial dysfunction induced by indomethacin in Caco-2 cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 195, n. 3, p. 199-205, 2012.

COLLODEL, G.; FEDERICO, M.G.; GEMINIANI, M.; MARTINI, S.; BONECHI, C.; ROSSI, C.; FIGURA, N.; MORETTI, E. Effect of trans-resveratrol on induced oxidative stress in human sperm and in rat germinal cells. **Reproductive Toxicology**, v. 31, p. 239-246, 2011.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos (Antioxidants properties of phenolic compounds). **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

De LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 48-54, 1997.

EDWARDS, R.L.; LYON, T.; LITWIN, S.E.; RABOVSKY, A.; SYMONS, J.D.; JALILI, T. Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 11, p. 2405-2411, 2007.

ESTEVEZ, S.C.; SHARMA, R.K.; THOMAS Jr, A.J.; AGARWAL, A. Improvement in motion characteristics and acrosome status in cryopreserved human spermatozoa by swim-up processing before freezing. **Human Reproduction**, v. 15, n. 10, p. 2173-2179, 2000.

FEDERICO, M.G.; COLLODEL, G.; RENIERI, T.; PASCARELLI, N.A.; GEMINIANI, M.; MARTINI, S.; BONECHI, C.; ROSSI, C.; MORETTI, E. Antioxidant effect of resveratrol in human spermatozoa and in rat germinal cells. **Journal of the Siena Scademy of Sciences**, v.1, p. 68-71, 2009.

GARCEZ, M.E.; BRANCO, C.S.; LARA, L.V.; PASQUALOTTO, F.F.; SALVADOR, M. Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 6, p. 2118-2121, 2010.

GIBB, Z.; BUTLER, T.J.; MORRIS, L.H.A.; MAXWELL, W.M.C.; GRUPEN, C.G. Quercetin improves the postthaw characteristics of cryopreserved sex-sorted and nonsorted stallion sperm. **Theriogenology**, v. 79, n. 6, p. 1001-1009, 2013.

HOLT, W.V.; O'BRIEN, J.; ABAIGAR, T. Applications and interpretation of computer-assisted sperm analyses and sperm sorting methods in assisted breeding and comparative research. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, p. 709-718, 2007.

KELLY, G.S. Quercetin. **Alternative Medicine Review**, v. 16, n. 2, p. 172-194, 2011.

KENNEDY, J.H.; KORN, N.; THURSTON, R.J. Prostaglandin levels in seminal plasma and sperm extracts of the domestic turkey, and the effects of cyclooxygenase inhibitors on sperm mobility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 1-7, 2003.

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

KOWALSKA, A.; KOWALSKI, R.K.; ZAKĘŚ, Z. The effect of selective cyclooxygenase (COX) inhibitors on japanese medaka (*Oryzias latipes*) reproduction parameters. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 53, p. 19-23, 2011.

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

LENZI, A.; PICARDO, M.; GANDINI, L.; DONDERO, F. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Human Reproduction Update**, v. 2, n. 3, p. 246-56, 1996.

LI, D.; CHEN, X.; YU, H. Resveratrol inhibits MMP-2 expression of hepatoma in nude mice. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 10, n. 1, p. 33-37, 2011.

LI, M.-W.; YUDIN, A.I.; VANDEVOORT, C.A.; SABEUR, K.; PRIMAKOFF, P.; OVERSTREET, J.W. Inhibition of monkey sperm hyaluronidase activity and heterologous cumulus penetration by flavonoids. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 1383-1389, 1997.

MARTÍN-HIDALGO, D.; LLERA, A.H.; HENNING, H.; WALLNER, U.; WABERSKI, D.; BRAGADO, M.J.; GIL, M.C.; GARCÍA-MARÍN, L.J. The effect of resveratrol on the quality of extended boar semen during storage at 17°C. **Journal of Agricultural Science**, v. 5, n. 8, p. 231-242, 2013.

MAZZI, L.; GEMINIANI, M.; COLLODEL, G.; IACOPONI, F.; MARTINI, S.; BONECHI, C.; ROSSI, C.; MORETTI, E. Quercetin and rutin: effects of two flavonoids on induced oxidative stress in human ejaculated sperm. **Journal of the Siena Academy of Sciences, Published Since**, v. 3, p. 22-26, 2011.

McNIVEN, M.A.; RICHARDSON, G.F. Chilled Storage of Stallion Semen Using Perfluorochemicals and Antioxidants. **Cell Preservation Technology**, v. 1, n. 3, p. 165-174, 2003.

MORETTI, E.; MAZZI, L.; TERZUOLI, G.; BONECHI, C. ; IACOPONI, F.; MARTINI, S.; ROSSI, C.; COLLODEL, G. Effect of quercetin, rutin, naringenin and epicatechin on lipid peroxidation induced in human sperm. **Reproductive Toxicology**, v. 34, p. 651- 657, 2012.

MORTIMER, S.T. CASA – Practical aspects. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 4, p. 515-524, 2000.

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

NUNES, J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução de pequenos ruminantes**. Fortaleza: Tecnograf, 2010. 208 p.

OLIVEIRA, M.E.F.; TEIXEIRA, P.P.M.; VICENTE, W.R.R. **Biotécnicas reprodutivas em ovinos e caprinos**. 1<sup>a</sup> Ed. São Paulo: Med Vet, 2013. 305 p.

PETROVSKI, G.; GURUSAMY, N.; DAS, D.K. Resveratrol in cardiovascular health and disease. **Annals of the New York Academy**, v. 1215, v.22-33, 2011.

PLANAS, J.M.; COLOM, H.; JUAN, M.E. Resveratrol: A polyphenol with multiple effects. **Recent Advances in Pharmaceutical Sciences**, v. 2, p. 101-120, 2011.

RANAWAT, P.; KAUSHIK, G.; SAIKIA, U.N.; PATHAK, C.M.; KHANDUJA, K.L. Quercetin impairs the reproductive potential of male mice. **Andrologia**, v. 45, n. 1, p.56-65, 2013.

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.

SARLÓS, P.; MOLNÁR, A.; KÓKAI, M.; GÁBOR, G.; RÁTKY, J. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 50, p. 235- 45, 2002.



SATORRE, M.; CÓRDOBA, M. Involvement of intracellular calcium and *src* tyrosine-kinase in capacitation of cryopreserved bovine spermatozoa. **InVet**, v. 12, n. 1, p. 75-83, 2010.

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

SILVA, E.C.B.; GUERRA, M.M.P. Terapias antioxidantes na criopreservação espermática. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 111, n. 583-584, p. 143-149, 2012.

SILVA, S.V.; SOARES, A.T.; BATISTA, A.M.; ALMEIDA, F.C.; NUNES, J.F.; PEIXOTO, C.A.; GUERRA, M.M.P. 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.

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

STERVBO, U.; VANG, O.; BONNESEN, C. Time- and concentration-dependent effects of resveratrol in HL-60 and HepG2 cells. **Cell Proliferation**, v. 39, p. 479-493, 2006.

STOJANOVIĆ, S.; SPRINZ, H.; BREDE, O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 391, n. 1, p. 79-89, 2001.

TURNER, T.T.; LYSIAK, J.J. Oxidative Stress: A Common Factor in Testicular Dysfunction. **Journal of Andrology**, v. 29, n. 5, p. 488-498, 2008.

VACCARI, N.F.S.; SOCCOL, M.C.H.; IDE, G.M. Compostos fenólicos em vinhos e seus efeitos antioxidantes na prevenção de doenças. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 8, n. 1, p. 71-83, 2009.

WANG, K.; LIU, R.; LI, J.; MAO, J.; LEI, Y.; WU, J.; ZENG, J.; ZHANG, T.; WU, H.; CHEN, L.; HUANG, C.; WEI, Y. Quercetin induces protective autophagy in gastric cancer cells: involvement of Akt-mTOR- and hypoxia-induced factor 1 $\alpha$ -mediated signaling. **Autophagy**, v. 7, n. 9, p. 966-978, 2011.

WILLIAMS, K.M.; FORD, W.C.L. Effects of Ca-ATPase inhibitors on the intracellular calcium activity and motility of human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 26, p. 366-375, 2003.

ZHENG, J.; RAMIREZ, V.D. Inhibition of mitochondrial proton F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, 1115-1123, 2000.

ZINI, A.; AL-HATHAL, N. Antioxidant therapy in male infertility: fact or fiction?. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, p. 374-381, 2011.

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

**Tabela 1** - Parâmetros cinéticos (Média ± DP) de amostras seminais caprinas congeladas em diluidor à base de leite desnatado (7% glicerol), adicionado de diferentes concentrações de resveratrol (0, 15, 25, 50, 75 e 100 µM) e avaliadas 0 e 1 h após descongelação

	R0	R15	R25	R50	R75	R100
<b>Tempo 0 h</b>						
MT (%)	54,3±19,3	50,1±21,0	47,3±18,5	44,8±15,7	49,7±9,6	57,8±10,8
MP (%)	20,4±8,6	20,2±12,2	17,4±7,2	13,9±6,5	16,0±5,4	16,8±8,7
VCL (µm/s)	67,5±5,9	72,1±11,7	75,5±7,7	68,3±6,5	67,6±12,4	70,5±7,7
VSL (µm/s)	37,9±4,9	40,0±8,9	41,7±4,7	35,0±6,8	35,4±7,2	34,4±5,5
VAP (µm/s)	47,3±5,0	50,1±10,1	53,0±5,2	45,0±6,2	45,0±10,2	45,1±6,3
LIN (%)	56,2±5,1	55,0±5,3	55,4±5,6	51,0±7,0	52,2±3,2	48,7±3,8
STR (%)	80,2±4,3	79,5±4,8	78,8±5,1	77,4±6,3	79,0±4,2	76,4±4,1
WOB (%)	70,0±3,6 <sup>a</sup>	69,1±3,6 <sup>ab</sup>	70,2±2,8 <sup>a</sup>	65,8±3,9 <sup>ab</sup>	66,2±2,7 <sup>ab</sup>	63,7±2,8 <sup>b</sup>
ALH (µm)	2,8±0,3	2,9±0,2	3,1±0,4	3,1±0,2	2,9±0,2	3,2±0,2
BCF (Hz)	11,5±1,3	11,9±1,5	11,6±0,8	12,2±0,8	12,3±0,8	12,5±1,2
<b>Tempo 1 h</b>						
MT (%)	37,0±14,8	41,7±13,0	39,5±14,0	33,1±11,7	33,5±14,5	35,0±13,5
MP (%)	11,7±3,5	14,7±7,1	14,0±8,5	12,5±7,0	11,5±5,9	12,4±8,3
VCL (µm/s)	62,5±9,5	65,5±11,1	64,3±13,9	65,1±9,9	64,4±15,6	63,5±15,2
VSL (µm/s)	33,1±7,0	35,3±8,5	34,0±9,5	34,3±6,0	34,1±10,2	33,2±10,4
VAP (µm/s)	40,9±6,7	44,3±9,8	42,2±10,3	41,8±6,6	42,1±11,4	41,2±11,7
LIN (%)	52,6±3,9	53,4±3,7	52,3±3,9	52,6±1,5	52,4±3,8	51,8±3,7
STR (%)	80,3±3,6	79,5±2,1	80,1±4,0	82,0±1,5	80,5±3,7	80,3±2,2
WOB (%)	65,5±3,0	67,2±3,5	65,3±2,0	64,2±1,0	65,0±2,4	64,4±3,3
ALH (µm)	2,9±0,2	2,9±0,2	2,9±0,1	3,0±0,2	3,0±0,4	3,0±0,3
BCF (Hz)	13,1±1,4	12,7±0,8	12,8±0,9	13,7±0,6	13,3±0,9	13,3±0,5

Letras diferentes na mesma linha demonstram diferença entre os grupos (P<0,05). MT: motilidade total; MP: motilidade progressiva; VCL: velocidade curvilínea; VSL: velocidade linear progressiva; VAP: velocidade média da trajetória; LIN: linearidade; STR: retilinearidade; WOB: oscilação; ALH: amplitude de deslocamento lateral de cabeça; BCF: frequência de batimento flagelar cruzado.

**Tabela 2** - Parâmetros cinéticos (Média ± DP) de amostras seminais caprinas congeladas em diluidor à base de leite desnatado (7% glicerol), adicionado de diferentes concentrações de quercetina (0, 15, 25, 50, 75 e 100 µM) e avaliadas 0 e 1 h após descongelação

	Q0	Q15	Q25	Q50	Q75	Q100
<b>Tempo 0 h</b>						
MT (%)	57,6±11,7	72,1±10,2	65,3±11,4	65,4±10,2	65,2±10,3	61,6±17,7
MP (%)	23,5±6,1	28,5±5,9	25,0±3,3	26,8±1,8	22,8±2,6	21,7±5,5
VCL (µm/s)	91,8±8,2	85,9±10,7	87,9±11,1	83,7±11,1	86,6±8,5	88,7±8,6
VSL (µm/s)	50,0±6,9	45,3±6,3	46,1±6,6	43,8±6,2	42,5±2,8	42,1±3,3
VAP (µm/s)	64,7±7,1	59,1±7,6	60,2±9,0	56,3±8,6	56,7±5,1	56,6±5,3
LIN (%)	54,4±5,8	52,9±5,6	52,6±5,0	52,6±5,8	49,3±4,2	47,6±3,8
STR (%)	77,1±4,3	76,8±5,0	76,8±4,2	78,1±5,1	75,2±3,8	74,5±3,3
WOB (%)	70,5±4,0 <sup>a</sup>	68,8±3,3 <sup>ab</sup>	68,4±3,9 <sup>ab</sup>	67,2±4,1 <sup>ab</sup>	65,6±3,0 <sup>ab</sup>	63,9±2,8 <sup>b</sup>
ALH (µm)	3,2±0,4	3,14±0,4	3,2±0,4	3,1±0,4	3,4±0,3	3,4±0,3
BCF (Hz)	12,1±1,1	11,6±0,9	12,1±0,7	12,4±0,8	12,2±1,1	12,9±1,0
<b>Tempo 1 h</b>						
MT (%)	34,6±12,9	41,1±20,8	40,2±15,0	34,8±15,0	37,3±14,7	38,5±10,4
MP (%)	15,3±6,5	16,0±8,6	16,7±8,5	15,4±10,1	17,8±9,3	18,8±4,8
VCL (µm/s)	71,4±9,8	66,5±11,2	67,7±9,5	68,4±14,2	66,9±14,4	74,2±5,6
VSL (µm/s)	40,7±5,8	37,4±6,5	38,4±6,6	38,4±8,4	38,9±8,0	42,9±5,8
VAP (µm/s)	48,5±7,1	45,4±7,6	46,3±7,5	46,1±9,1	45,5±9,3	50,5±5,7
LIN (%)	57,1±3,7	56,4±5,3	56,8±5,2	56,1±2,4	58,4±3,6	57,8±5,3
STR (%)	84,2±3,8	82,3±3,7	83,0±3,7	83,0±3,6	85,4±2,6	84,8±2,9
WOB (%)	67,8±2,2	68,3±3,5	68,3±3,3	67,7±1,7	68,3±2,4	68,0±4,2
ALH (µm)	3,0±0,3	2,9±0,3	2,9±0,3	2,9±0,3	2,7±0,3	3,0±0,3
BCF (Hz)	13,4±0,7	13,1±0,3	13,4±0,4	13,5±1,1	13,8±0,8	14,0±0,7

Letras diferentes na mesma linha demonstram diferença entre os grupos (P<0,05). MT: motilidade total; MP: motilidade progressiva; VCL: velocidade curvilínea; VSL: velocidade linear progressiva; VAP: velocidade média da trajetória; LIN: linearidade; STR: retilinearidade; WOB: oscilação; ALH: amplitude de deslocamento lateral de cabeça; BCF: frequência de batimento flagelar cruzado.

**Tabela 3** - Integridade de membrana plasmática e acrossomal, morfologia normal e estresse oxidativo negativo (Média  $\pm$  DP) de amostras de sêmen caprino congeladas em diluidor à base de leite desnatado (7% glicerol), adicionado de diferentes concentrações de resveratrol (0, 15, 25, 50, 75 e 100  $\mu$ M) e avaliadas nos tempos 0 e 1 h após descongelação

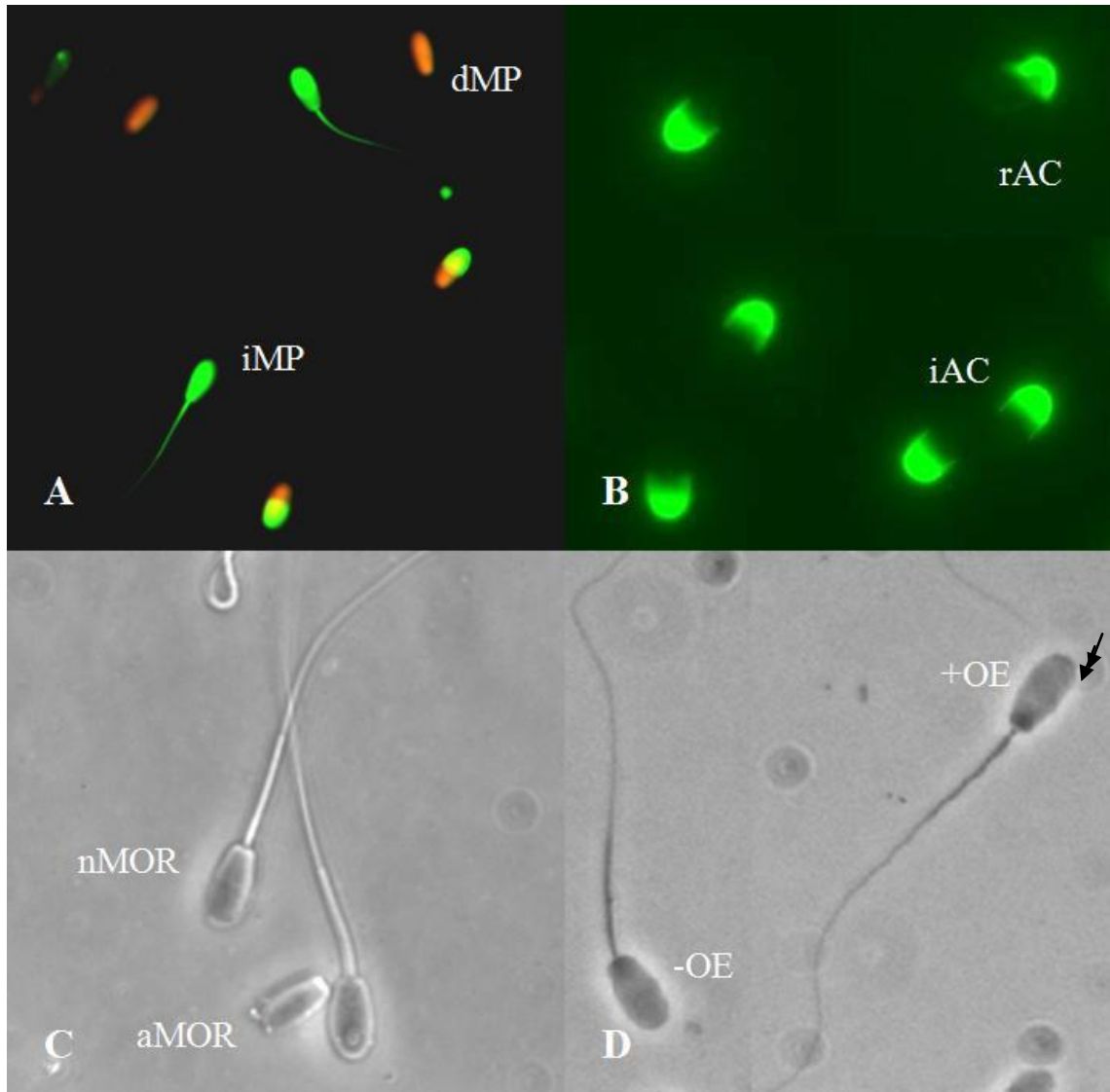
	R0	R15	R25	R50	R75	R100
Tempo 0h						
iMP (%)	34,7 $\pm$ 12,2	39,5 $\pm$ 10,4	37,2 $\pm$ 7,6	39,4 $\pm$ 3,6	38,5 $\pm$ 10,6	32,8 $\pm$ 10,3
iAC (%)	44,3 $\pm$ 9,2	49,8 $\pm$ 7,5	51,3 $\pm$ 3,1	49,6 $\pm$ 7,0	51,6 $\pm$ 8,7	47,9 $\pm$ 11,2
nMOR (%)	88,5 $\pm$ 5,9	87,9 $\pm$ 2,9	88,1 $\pm$ 2,3	85,2 $\pm$ 3,7	86,2 $\pm$ 2,0	85,9 $\pm$ 2,6
-OE (%)	73,5 $\pm$ 6,7	74,5 $\pm$ 2,1	76,5 $\pm$ 2,1	76,2 $\pm$ 6,7	72,7 $\pm$ 6,5	77,8 $\pm$ 5,7
Tempo 1h						
iMP (%)	18,2 $\pm$ 6,2	20,4 $\pm$ 7,0	19,8 $\pm$ 8,8	18,4 $\pm$ 4,6	22,6 $\pm$ 7,2	23,3 $\pm$ 4,2
iAC (%)	43,5 $\pm$ 19,0	46,0 $\pm$ 10,4	43,7 $\pm$ 5,6	41,8 $\pm$ 5,6	46,1 $\pm$ 6,8	49,3 $\pm$ 6,6
nMOR (%)	87,6 $\pm$ 2,7	87,7 $\pm$ 3,6	86,9 $\pm$ 4,9	86,8 $\pm$ 4,1	84,6 $\pm$ 8,4	86,1 $\pm$ 4,2
-OE (%)	72,7 $\pm$ 5,3	72,3 $\pm$ 5,6	73,5 $\pm$ 6,0	72,5 $\pm$ 4,3	69,8 $\pm$ 2,0	71,5 $\pm$ 7,2

iMP: integridade de membrana plasmática; iAC: integridade de acrossoma; nMOR: morfologia normal; -EO: estresse oxidativo negativo.

**Tabela 4** - Integridade de membrana plasmática e acrossomal, morfologia normal e estresse oxidativo negativo (Média  $\pm$  DP) de amostras de sêmen caprino congeladas em diluidor à base de leite desnatado (7% glicerol), adicionado de diferentes concentrações de quercetina (0, 15, 25, 50, 75 e 100  $\mu$ M) e avaliadas nos tempos 0 e 1 h após descongelação

	Q0	Q15	Q25	Q50	Q75	Q100
Tempo 0h						
iMP (%)	47,3 $\pm$ 8,9	44,3 $\pm$ 11,4	49,3 $\pm$ 9,6	48,5 $\pm$ 12,2	46,6 $\pm$ 9,2	46,0 $\pm$ 10,3
iAC (%)	53,3 $\pm$ 6,7	56,9 $\pm$ 9,3	57,4 $\pm$ 9,3	56,6 $\pm$ 9,57	57,8 $\pm$ 8,0	58,2 $\pm$ 9,0
nMOR (%)	90,4 $\pm$ 5,1	90,9 $\pm$ 8,3	91,7 $\pm$ 5,0	92,8 $\pm$ 1,9	91,7 $\pm$ 5,9	91,7 $\pm$ 5,5
-OE (%)	73,8 $\pm$ 2,7	77,7 $\pm$ 3,0	79,5 $\pm$ 3,7	78,8 $\pm$ 4,6	77,5 $\pm$ 5,2	77,3 $\pm$ 6,0
Tempo 1h						
iMP (%)	23,5 $\pm$ 7,1	23,0 $\pm$ 8,4	25,8 $\pm$ 6,8	25,3 $\pm$ 9,8	24,6 $\pm$ 8,9	25,8 $\pm$ 9,8
iAC (%)	49,4 $\pm$ 10,2	50,6 $\pm$ 6,9	48,8 $\pm$ 6,2	51,2 $\pm$ 7,5	45,0 $\pm$ 5,3	47,9 $\pm$ 4,4
nMOR (%)	91,0 $\pm$ 5,2	92,8 $\pm$ 1,3	94,8 $\pm$ 1,1	94,1 $\pm$ 1,3	94,8 $\pm$ 1,6	95,4 $\pm$ 2,0
-OE (%)	70,7 $\pm$ 4,4	72,5 $\pm$ 6,9	75,0 $\pm$ 8,3	71,7 $\pm$ 5,6	71,2 $\pm$ 7,0	70,5 $\pm$ 6,7

iMP: integridade de membrana plasmática; iAC: integridade de acrossoma; nMOR: morfologia normal; -EO: estresse oxidativo negativo.



**Figura 1** - Análise microscópica dos espermatozoides. (A) Integridade da membrana plasmática: membrana plasmática íntegra (iMP) e danificada (dMPd); (B) Integridade de acrossoma: acrossoma intacto (iAC) e reagido (rAC); (C) Morfologia espermática: espermatozoide morfologicamente normal (nMOR) e anormal (aMOR); (D) Estresse oxidativo: espermatozoide sem estresse oxidativo (-EO) e com estresse oxidativo (+EO).

### 4.3 Uso de compostos fenólicos durante a separação e criopreservação de espermatozoides caprinos

*Use of phenolic compounds for sorting and cryopreservation of goat sperm*

Ellen Cordeiro Bento da Silva<sup>a</sup>, Igor Henrique de Azevedo Valença Nery<sup>a</sup>, Robespierre Augusto Joaquim Araújo Silva<sup>a</sup>, Juliana Arandas Borba Monteiro<sup>a</sup>, Joane Isis Travassos Vieira<sup>a</sup>, Helder Melo de Souza<sup>a</sup>, Maria Madalena Pessoa Guerra<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Andrologia, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

#### RESUMO

Foi objetivado avaliar o efeito da adição dos antioxidantes (+)-catequina, (-)-epigallocatequina galato (EGCG), quercetina ou resveratrol nos meios para centrifugação em gradientes contínuos de densidade de Percoll e no diluidor de congelamento de espermatozoides caprinos. *Pools* de sêmen foram centrifugados em gradientes de Percoll e congelados (com ou sem antioxidantes), avaliados antes e após a separação, assim como após descongelamento. A motilidade progressiva (MP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR) e oscilação (WOB) de amostras do sêmen selecionado por centrifugação em gradientes de Percoll foram maiores ( $P < 0,05$ ) do que naquele não selecionado; assim como a velocidade linear progressiva (VSL) ( $P < 0,05$ ) dos grupos adicionados de catequina ou resveratrol. A ALH (amplitude de deslocamento lateral de cabeça) foi maior ( $P < 0,05$ ) no grupo não selecionado do que nos demais, e a quercetina reduziu ( $P < 0,05$ ) o potencial de membrana mitocondrial (PMM) dos espermatozoides selecionados, em relação aos demais grupos. Após descongelamento, a MP, LIN, WOB, VSL e VAP (velocidade média da trajetória) foram maiores ( $P < 0,05$ ) no sêmen selecionado do que no não selecionado, com exceção dos tratados com EGCG e quercetina. A catequina aumentou ( $P < 0,05$ ) a STR em relação ao sêmen não selecionado; enquanto que a ALH foi menor ( $P < 0,05$ ) nos grupos selecionados com ou sem catequina ou resveratrol e o BCF (batimento flagelar cruzado) em amostras selecionadas sem antioxidante, frente ao não selecionado. A integridade de membrana plasmática foi maior ( $P < 0,05$ ) nos grupos selecionados do que no não selecionado (exceto para a EGCG) e o PMM foi menor ( $P < 0,05$ ) nos grupos não



selecionado e tratado com quercetina em relação aos demais. A porcentagem de células intactas e de não mortas foi maior ( $P < 0,05$ ) no sêmen selecionado congelado do que no não selecionado. Assim, a centrifugação de espermatozoides em gradiente contínuo de densidade de Percoll é um método viável para a espécie caprina e compatível com o processo de congelação; independente da terapia antioxidante usada.

**Palavras chave:** antioxidantes; congelação de sêmen; estilbenos; estresse oxidativo; flavonoides; gradiente de densidade.

### ABSTRACT

It was aim to evaluate the effect of (+)-catechin, (-)-epigallocatechic acid gallate (EGCG), resveratrol and quercetin addition on means to centrifugation in continuous Percoll density gradient and freezing extender to goat sperm. Semen *pools* were centrifugated in Percoll gradients and frozen (with or without antioxidants), and analyzed before and after sorting, as well as after thawing. The progressive motility (PM), linearity (LIN), straightness (STR) and wobble (WOB) was higher ( $P < 0.05$ ) to selected than to non-selected semen, which was repeated to straight linear velocity (VSL) ( $P < 0.05$ ) in the groups treated with catechin or resveratrol. The amplitude of lateral movement of the head (ALH) was higher ( $P < 0.05$ ) in non-selected group than in the other, and quercetin reduced ( $P < 0.05$ ) the mitochondrial membrane potential (MMP) after selection, compared to other groups. After thawing, PM, LIN, WOB, VSL and average path velocity (VAP) were higher ( $P < 0.05$ ) in selected than in non-selected semen. Catechin increased ( $P < 0.05$ ) STR compared to not-selected semen, while ALH was lower ( $P < 0.05$ ) in the selected group with or without catechin or resveratrol, and beat cross frequency (BCF) without antioxidant, against not-selected group. The plasma membrane integrity was higher ( $P < 0.05$ ) in the selected group than in non-selected (except to EGCG) and MMP was lower ( $P < 0.05$ ) in not-selected and quercetin groups than in the other. The percentage of intact and not dead cells was higher ( $P < 0.05$ ) in frozen selected than in non-selected semen. Thus, sperm centrifugation by continuous gradients of Percoll density is a feasible method to goats and compatible with freezing process; independent of antioxidant therapy used.

**Keywords:** antioxidants; density gradient; flavonoids; oxidative stress; semen freezing; stilbenes.

## INTRODUÇÃO

A possibilidade de pré-determinar o sexo da cria pela sexagem espermática é um desejo permanente da indústria pecuária (VAN MUNSTER et al., 1999; ALMEIDA e ALVAREZ, 2003). Na espécie caprina, o uso do sêmen sexado, em associação a outras biotécnicas da reprodução, é considerado como um meio de aumentar a eficiência reprodutiva e produtiva desses animais (PARRILLA et al., 2004; RAHMAN et al., 2008). Aliado a isso, a grande diferença entre o conteúdo de DNA de espermatozoides caprinos, portadores dos cromossomos X e Y (4,4%), torna a técnica de sexagem atrativa para essa espécie (PARRILLA et al., 2004).

Resultado satisfatório foi obtido após sexagem de espermatozoides caprinos em citômetro de fluxo, cuja acuidade de separação foi superior a 90% (BATHGATE et al., 2013). Em contrapartida, neste estudo, a qualidade do sêmen sexado e congelado foi baixa e a fertilidade, após inseminação artificial com a população de espermatozoides X, foi comprometida. Assim, métodos alternativos mais simples (ANDERSEN e BYSKOV, 1997; RESENDE et al., 2009), baratos (KANESHARATNAM et al., 2012; SUREKA et al., 2013), menos nocivos aos espermatozoides (EVANS et al., 2004) e que permitam a congelação destes gametas, sem redução da fertilidade (HOSSEPIAN de LIMA, 2007; HOSSEPIAN de LIMA et al., 2011), são buscados.

A técnica de sexagem em gradientes de densidade de Percoll tem se destacado por possibilitar a separação de espermatozoides X e Y com menor custo e sem prejuízo à viabilidade desses gametas (HOSSEPIAN de LIMA et al., 2003; RESENDE et al., 2009), apesar de sua menor acuidade (RESENDE et al., 2009). No entanto, esta técnica também pode gerar injúrias aos espermatozoides, com consequente diminuição da resistência à congelação (OLIVEIRA et al., 2012), visto que esta última já representa um fator estressante aos gametas (LEBOEUF et al., 2000; PESCH e BERGMAN, 2006).

A maior razão para a redução da sobrevivência espermática durante a sexagem (KLINC et al., 2007; KLINC e RATH, 2007), bem como a congelação do sêmen (MAIA e BICUDO, 2009; BANSAL e BILASPURI, 2011), parece ser a geração exacerbada das espécies reativas de oxigênio (ROS) e dos consequentes danos oxidativos. Assim, terapias antioxidantes, durante a sexagem e/ou criopreservação espermática, têm sido realizadas a fim de minimizar os danos decorrentes destes processos e apresentam resultados

satisfatórios, embora restritos à sexagem por citometria de fluxo (KLINC e RATH, 2007; CHUNMEI et al., 2012; LI et al., 2012).

Todavia, a criação de estratégias que melhorem a qualidade do sêmen sexado em gradientes de densidade e submetido à criopreservação também são necessárias. Por conseguinte, com base no alto poder antioxidante dos compostos fenólicos (SARLÓS et al., 2002; BARREIROS et al., 2006; SIMOS et al., 2012), foi objetivado neste estudo avaliar o efeito da adição dos antioxidantes (+)-catequina, (-)-epigallocatequina galato (EGCG), quercetina ou resveratrol nos meios utilizados para centrifugação em gradientes contínuos de densidade de Percoll e no diluidor de congelamento de espermatozoides caprinos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Com exceção dos abaixo descritos, todos os reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St Louis, MO, USA).

### **Animais e local do estudo**

O estudo foi realizado após aprovação pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE - Brasil), sob o número de processo CEEUA/UFRPE 014/2012. Foram utilizados cinco reprodutores caprinos, sexualmente maduros, com fertilidade comprovada (dois Saanen, dois Toggenburg e um Alpino Britânico) e com idades variando entre um e quatro anos. Os animais foram criados na UFRPE, Pernambuco, Brasil (08° 03' 14'' S; 34° 52' 52'' W) e alimentados com feno de tifton e concentrado, além de água e sal mineral *ad libitum*.

### **Colheita de sêmen**

As colheitas de sêmen foram realizadas três vezes por semana, pelo método da vagina artificial, com uma fêmea como manequim, totalizando 30 ejaculados, sendo seis de cada reprodutor. Amostras de sêmen *in natura* foram subjetivamente examinadas quanto ao turbilhonamento (0-5), motilidade (0-100%) e vigor (0-5) em microscópio óptico de contraste de fase (Olympus, Tóquio, Japão; 100 X). Apenas ejaculados aprovados

(turbilhonamento  $\geq 3$ , motilidade  $\geq 70\%$ , vigor  $\geq 3$ ) foram destinados à formação do *pool* seminal, totalizando seis *pools* (n=6).

### **Centrifugação dos espermatozoides caprinos em gradientes contínuos de densidade de Percoll**

#### Preparação dos gradientes contínuos de densidade de Percoll

Os gradientes de densidade de Percoll foram preparados conforme descrito por OLIVEIRA et al. (2011) e RESENDE et al. (2011), com modificações. A princípio, uma solução isotônica de Percoll 90% foi preparada, a partir da diluição (9:1; v:v) do Percoll comercial (Percoll™; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Rapskatan, Uppsala Suécia; 17089101) em meio DMEM 10X concentrado [135 g DMEM (D7777), 0,3% BSA (A6003), 10 mg/L antibiótico, 6 mM HEPES (H3375), 1 L água Milli-Q q.s.p). A solução de Percoll 90% foi utilizada como base para a formação das soluções de Percoll 85 e 80%, o que foi possível pela rediluição em meio DMEM 1X concentrado (13,5 g DMEM, 0,3% BSA, 10 mg/L antibiótico, 6 mM HEPES, 1 L água Milli-Q q.s.p.). Os meios DMEM 10X e 1X concentrados foram filtrados em poros de 0,22  $\mu\text{m}$ , após preparação, e estocados a 4 °C, por no máximo duas semanas. As soluções de Percoll 90, 85 e 80% foram fracionadas em seis alíquotas e tratadas conforme os grupos experimentais [S: controle selecionado (sem antioxidante); SC75: selecionado com catequina (C1251) 75  $\mu\text{M}$ ; SE100: selecionado com EGCG (E4143) 100  $\mu\text{M}$ ; SQ25: selecionado com quercetina (Q4951) 25  $\mu\text{M}$ ; SR25: selecionado com resveratrol (R5010) 25  $\mu\text{M}$ ; SR75: selecionado com resveratrol 75  $\mu\text{M}$ ]. Todas as soluções de Percoll preparadas tiveram seu pH ajustado para próximo de 7,4 com ácido acético (695092) ou solução de hidróxido de sódio (Nuclear, 311913; 1 M). O mesmo foi feito para a osmolaridade, a qual foi ajustada com soluções de Percoll correspondentes, diluídas em água ou em DMEM 10X concentrado, conforme a finalidade. A osmolaridade foi ajustada para próximo de 300 mmol/Kg H<sub>2</sub>O (290 a 320 mmol/Kg H<sub>2</sub>O), que é considerada fisiológica e não deletéria à célula (WANG et al., 1994). A partir disso, foram obtidas três soluções isotônicas de Percoll com densidades de 1,121, 1,111 e 1,101 g/mL, correspondentes às soluções de Percoll 90, 85 e 80%, respectivamente (Figura 1A). Para a formação dos gradientes contínuos de densidade de Percoll, as três soluções isotônicas obtidas foram depositadas, com auxílio de um pipetador automático, em tubos

plásticos de poliestireno com capacidade para 15 mL (Figura 1B). A deposição das soluções de Percoll foi feita no sentido da mais densa para a menos densa, de modo que cada gradiente foi constituído por três camadas de 2 mL cada, conforme o grupo experimental. Após preparação dos gradientes de Percoll, estes foram acondicionados sobre refrigeração (5 °C) durante 24 h para que se tornassem contínuos (Figura 1C). Antes do uso, os gradientes de Percoll foram acondicionados em banho Maria (37 °C) durante 3 h (SRISOMBUT et al., 2001), sobre abrigo da luz (Figura 1D).

#### Processamento do sêmen para a centrifugação em gradiente contínuo de densidade de Percoll

Cada um dos seis *pools* de sêmen (NS: controle não selecionado) foi avaliado quanto à cinética espermática, integridade de membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial, integridade de acrossoma, morfologia e concentração espermática; conforme descrito abaixo. Ao término das análises, amostras de sêmen foram fracionadas em sete alíquotas, as quais foram submetidas à centrifugação em gradientes de Percoll com adição ou não de antioxidantes, ou processadas convencionalmente para a congelação. Para a seleção dos espermatozoides, seis alíquotas de sêmen foram diluídas em DMEM 1X (pH 6,8) para a concentração de  $800 \times 10^6$  espermatozoides/mL, adicionado ou não de antioxidantes, de acordo com os grupos experimentais (S; SC75; SE100; SQ25; SR25; SR75). Tais amostras de sêmen foram homogeneizadas e alíquotas (500 µL) depositadas sobre os respectivos gradientes de densidade (Figura 1E), conforme o antioxidante utilizado. Os tubos contendo os gradientes foram centrifugados a 2000 rpm em rotor horizontal (Baby®I, Modelo 206 BL, Fanem® Ltda., SP, Brasil), durante 20 min, a temperatura ambiente (24 °C; Figura 1F). Após centrifugação, os sobrenadantes foram removidos, com auxílio de um pipetador automático, e os pellets de espermatozoides foram recuperados (Figura 1G e H). O volume recuperado de cada amostra foi fixado para 1 mL por gradiente. A seguir, os espermatozoides foram lavados em meio DMEM 1X (pH 6,8;  $250 \times g / 5$  min) por duas vezes e avaliados da mesma forma utilizada anteriormente em *pools* de amostras de sêmen (cinética espermática, integridade de membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial, integridade de acrossoma, morfologia e concentração espermática).

## **Processamento do sêmen para a congelação**

Para a congelação, uma alíquota do sêmen *in natura* foi processada convencionalmente, tendo sido este o grupo controle não selecionado e congelado (NSc). Neste caso, o sêmen foi diluído em solução tampão Tris [3,605 g Tris-hidroximetil aminometano (T1378), 2,024 g ácido cítrico (C2404), 1,488 g frutose (F3510) e 100 mL água Milli-Q, pH 6,8. 1:9; v:v] e centrifugado (250 X g / 10 min) duas vezes, para a remoção do plasma seminal. Em seguida, a amostra seminal foi diluída em meio à base de leite desnatado [10 g leite desnatado em pó, 194 mg D-(+)-glucose (G6152), 100 mL água Milli-Q, 7% glicerol (G2025), pH 6,8], para a concentração de  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL. No caso do sêmen selecionado, após lavagem em meio DMEM 1X (pH 6,8), as amostras foram diluídas em meio à base de leite desnatado com ou sem antioxidantes, conforme os grupos experimentais a serem congelados (Sc; SC75c; SE100c; SQ25c; SR25c; SR75c), para a concentração de  $40 \times 10^6$  espermatozoides/mL. O sêmen diluído foi envasado em palhetas (0,25 mL) e congelado em sistema automático (TK-3000<sup>®</sup>, TK Tecnologia em congelação Ltda, Uberaba, Brasil), utilizando curva lenta, específica para sêmen caprino (- 0,25 °C/min até atingir 5 °C, tempo de estabilização de 120 min a 5 °C e - 20 °C/min até atingir -120 °C). Por fim, as palhetas foram submersas e armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C), até a descongelação. As soluções de trabalho (10 mM) de antioxidantes foram preparadas a partir da rediluição das soluções estoque (100 mM em DMSO; D4540) em solução tampão Tris, visando minimizar a interferência do DMSO sobre a osmolaridade dos gradientes.

## **Descongelação e avaliação do sêmen**

Após uma semana da congelação, foram descongeladas (37 °C / 30 s) duas palhetas de sêmen por grupo experimental e as análises foram executadas conforme descrito abaixo. Este processo foi realizado seis vezes para cada grupo experimental (n=6), tanto para amostras de sêmen *in natura* (com exceção das avaliações do estresse oxidativo e translocação da fosfatidilserina), quanto para amostras descongeladas.

## Cinética espermática

Alíquotas de sêmen *in natura* não selecionado ou selecionado, com ou sem antioxidantes, foram diluídas em DMEM 1X para a concentração aproximada de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL, a fim de evitar sobreposição de imagens. Entre as amostras submetidas à congelação e descongelação, apenas o grupo não selecionado foi rediluído antes da análise da cinética, uma vez que os selecionado foram congelados com concentração espermática 5 vezes menor. Para a realização da análise, uma alíquota de sêmen (5  $\mu$ L) foi depositada sobre uma lâmina previamente aquecida (37 °C) e coberta com lamínula. Em seguida, foi analisada em um microscópio de contraste de fase (100 X; Nikon<sup>TM</sup> H5505, Eclipse 50i, Tóquio, Japão) e as imagens capturadas utilizando uma câmera de vídeo (Basler Vision Technologie<sup>TM</sup> A312FC, Ahrensburg, Alemanha). Foram analisados cinco campos não consecutivos, selecionados aleatoriamente, por amostra, com registro de, no mínimo, 2000 espermatozoides. Os parâmetros analisados utilizando o Sperm Class Analyzer - SCA<sup>TM</sup> software v. 5.1 (Microptics, S.L., Barcelona, Espanha) foram: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade curvilínea (VCL,  $\mu$ m/s), velocidade linear progressiva (VSL,  $\mu$ m/s), velocidade média da trajetória (VAP,  $\mu$ m/s), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %), oscilação (WOB, %), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH,  $\mu$ m) e frequência de batimento flagelar cruzado (BCF, Hz).

## Integridade de membrana plasmática

A integridade da membrana plasmática foi determinada pelo método de coloração dupla com diacetato de carboxifluoresceína (DCF; C5041) e iodeto de propídio (IP; P4170), segundo SILVA et al. (2011), antes e após os processos de centrifugação em gradientes de Percoll e congelação. Alíquotas (50  $\mu$ L) de sêmen foram diluídas em 150  $\mu$ L de solução Tris, contendo 5  $\mu$ L DCF (0.46 mg/mL em DMSO) e 20  $\mu$ L IP (0.5 mg/mL em PBS), incubadas por 10 min a 37 °C e fixadas com PBS contendo 0,5% de glutaraldeído. Uma alíquota (5  $\mu$ L) da mistura foi depositada sobre lâmina e coberta com lamínula. Um total de 200 células foi analisado por lâmina, em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha; 400 X), usando filtros DBP 485/20 nm para excitação e DBP 580 a

630-nm para emissão. Fluorescências verde e vermelha foram interpretadas como espermatozoides portadores de membrana plasmática intacta e danificada, respectivamente.

#### Potencial de membrana mitocondrial

Para a determinação do potencial de membrana mitocondrial, antes e após congelação do sêmen caprino, foi utilizada a sonda fluorescente JC-1 (T4069), conforme metodologia descrita por SILVA et al. (2012). Alíquotas (50  $\mu$ L) de sêmen foram diluídas em 150  $\mu$ L de tampão Tris contendo 5  $\mu$ L de JC-1 (0,15 mM em DMSO), incubadas por 10 min a 37 °C e fixadas com PBS contendo 0,5% de glutaraldeído. Uma alíquota (5  $\mu$ L) da mistura foi depositada entre lâmina e lamínula e analisada em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha; 400 X), usando filtros BP 450/490 nm para excitação e LP 515-nm para emissão. Um total de 200 espermatozoides foi analisado por lâmina e classificados como portadores de alto potencial de membrana mitocondrial, quando a peça intermediária fluorescia em laranja, ou como portadores de baixo potencial de membrana mitocondrial, quando a fluorescência emitida era verde.

#### Integridade de acrossoma

Para a determinação da integridade do acrossoma foi utilizada a sonda isotiocianato de fluoresceína conjugado a *Peanut agglutinin* (FITC-PNA; L7381) (SILVA et al., 2012). Estiraços foram preparados com alíquotas (10  $\mu$ L) de sêmen (selecionadas ou não, antes e após congelação), os quais foram secos a temperatura ambiente e armazenados a 4 °C. Para a análise, uma alíquota (30  $\mu$ L) da solução de trabalho de FITC-PNA (100  $\mu$ g/mL em PBS) foi depositada sobre a lâmina, a qual foi incubada em câmara úmida a 4 °C por 20 min, lavada em PBS e seca no escuro. Imediatamente antes da avaliação, 5  $\mu$ L de meio de montagem [4,5 mL glicerol, 0,5 mL PBS, 5 mg azida sódica (S8032) e 5 mg p-phenylenediamine (P6001)] foi depositado sobre o estiraço e coberto com lamínula. Um total de 200 espermatozoides por lâmina foi examinado, usando filtros LP 515-nm para emissão e 450 - 490 BP nm para excitação, em um microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha; 1000 X). Os espermatozoides foram classificados como portadores de acrossoma intacto, quando apresentavam a região acrossomal corada em



verde fluorescente, ou de acrossoma reagido, quando apresentavam fluorescência apenas na região equatorial da cabeça ou quando não corados em verde fluorescente.

## Morfologia

Para a análise da morfologia espermática do sêmen caprino selecionado ou não, antes e após congelação, foi empregado o método da câmara úmida (OLIVEIRA et al., 2013). Uma alíquota de sêmen foi diluída em solução de formol citrato (1:400 para o sêmen *in natura*; 1:10 para o sêmen selecionado e para o descongelado; v:v) e 10 µL desta solução foram depositados sobre lâmina, coberta com lamínula e vedada. Um total de 200 células foi analisado por lâmina, utilizando-se um microscópio de contraste de fase (Olympus, Tóquio, Japão; 1000 X), e classificadas como morfologicamente normais ou patológicas.

## Concentração e taxa de recuperação espermática

Para a análise da concentração espermática foi empregado o método da câmara de Neubauer (OLIVEIRA et al., 2013). Alíquotas de sêmen foram diluídas em solução de formol citrato na proporção de 1:400 para o sêmen *in natura* não selecionado e 1:10 para o sêmen selecionado (v:v). A contagem das células em câmara de Neubauer foi realizada utilizando-se um microscópio de contraste de fase (Olympus, Tóquio, Japão; 400 X) e os resultados foram utilizados para a obtenção da taxa de recuperação espermática, após o processo de centrifugação em gradientes de Percoll, bem como para a realização do cálculo de diluição. Com relação à taxa de recuperação espermática, esta foi calculada por meio de fórmula matemática [ $Tr = (Vf \times Cf / Vi \times Ci) \times 100$ ; Tr: taxa de recuperação, Vi: volume inicial da amostra; Vf: volume recuperado da amostra após centrifugação; Ci: concentração espermática inicial da amostra, Cf: concentração espermática recuperada após centrifugação], segundo OLIVEIRA et al. (2011).

## Estresse oxidativo

O estudo do estresse oxidativo dos espermatozoides caprinos foi realizado pelo teste *nitroblue tetrazolium* (NBT; N6639), conforme descrito por SALEH e AGARWAL

(2002), apenas para o sêmen descongelado (selecionado ou não). Amostras de sêmen foram diluídas (1:1; v:v) em solução de NBT (0,1% em PBS), incubadas por 30 min a 37 °C e por mais 30 min à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (250 X g / 5 min) e os pellets re-suspensos em solução Tris. Alíquotas (10 µL) deste material foram utilizadas para a formação dos estiraços, os quais foram secos à temperatura ambiente. Um total de 100 espermatozoides por lâmina foi analisado em microscópio de contraste de fase (Olympus, Tóquio, Japão; 1000 X). Os gametas foram classificados como portadores de estresse oxidativo, quando apresentavam depósito de formazan na região da cabeça ou peça intermediária, ou como não portadores de estresse oxidativo, quando o depósito de formazan era inexistente.

#### Translocação da fosfatidilserina

A translocação da fosfatidilserina para o lado externo da membrana plasmática, em células vivas ou mortas, foi determinada com a anexina V-Cy3 (A4963) em associação ao DCF (kit Anexina V-Cy3<sup>TM</sup> para a detecção da apoptose), segundo MARTÍ et al. (2006). Para isso, alíquotas (50 µL) de sêmen caprino (descongelado e selecionado ou não) foram diluídas em tampão de ligação 1X e coradas com 5 µL de DCF (0,46 mg/mL em DMSO) e 2 µL de anexina V-Cy3. Após incubação durante 10 min à temperatura ambiente, uma alíquota (5 µL) da amostra foi depositada entre lâmina e lamínula e analisada em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha; 400 X), utilizando-se filtros DBP 485/20 nm para excitação e DBP 580 a 630-nm para emissão. Foram analisados 200 espermatozoides por lâmina, os quais foram classificados como: DCF+/AnV- quando a célula era corada em verde, indicando que estava viva e sem translocação da fosfatidilserina (célula intacta); DCF+/AnV+ quando a célula apresentava coloração dupla (verde e vermelha), indicando que o espermatozoide estava vivo, porém com fosfatidilserina translocada (células apoptóticas); e DCF-/AnV+ quando a célula era corada em vermelho, indicando que estava morta.

#### Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias e desvios padrão (médias ± DP). Antes da realização das análises, os dados percentuais de cinética espermática, integridade de

membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial, integridade de acrossoma, espermatozoides morfológicamente normais, taxa de recuperação, estresse oxidativo negativo, células intactas, apoptóticas e mortas, foram transformados pelo arco seno. As comparações entre os grupos experimentais foram feitas com one-way ANOVA, seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer (INSTAT para Windows, versão 3.01), para detectar diferenças entre os grupos. Para todas as análises, foi considerado nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ ).

## RESULTADOS

### Sêmen *in natura* não selecionado e selecionado

Com relação à cinética espermática, amostras de sêmen caprino selecionadas em gradientes contínuos de densidade de Percoll apresentaram maior ( $P < 0,05$ ) motilidade progressiva, LIN, STR e WOB do que as amostras NS, independente do tratamento com antioxidantes. Por outro lado, a VSL foi maior ( $P < 0,05$ ) nos grupos selecionados na presença de catequina (75  $\mu\text{M}$ ) ou resveratrol (75  $\mu\text{M}$ ) em relação ao NS. A ALH do grupo NS foi superior ( $P < 0,05$ ) a dos selecionados, independente do tratamento antioxidante (Tabela 1). Em contrapartida, as porcentagens de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (Figura 2A), acrossoma íntegro (Figura 2C), morfologia normal (Figura 2D) e sem estresse oxidativo (Figura 2E) não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre os grupos experimentais, independente das terapias antioxidantes (Tabela 2).

A terapia antioxidante com quercetina determinou redução ( $P < 0,05$ ) do potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides caprinos (Tabela 2; Figura 2B), selecionados em gradientes contínuos de densidade de Percoll, em relação aos demais grupos experimentais. A taxa de recuperação (Tabela 2) não diferiu ( $P > 0,05$ ) entre os grupos experimentais submetidos à centrifugação em gradientes de Percoll, independente da terapia antioxidante utilizada. Deste modo, a taxa de recuperação média entre os grupos selecionados foi de 21,99%, com valor mínimo de 15,22% para o grupo selecionado com quercetina (25  $\mu\text{M}$ ) e máximo de 27,30% para o selecionado com resveratrol (25  $\mu\text{M}$ ).

## Sêmen não selecionado e selecionado submetidos ao processo de congelação

Após descongelação das amostras de sêmen caprino não selecionadas e selecionadas com ou sem antioxidantes, observou-se que a motilidade progressiva foi maior ( $P < 0,05$ ) nas amostras de sêmen selecionado do que nas de não selecionado; independente dos antioxidantes usados. A VSL e a VAP foram superiores ( $P < 0,05$ ) nas amostras de sêmen selecionado sem antioxidante ou adicionadas de catequina ( $75 \mu\text{M}$ ) do que o não selecionado. A LIN e a WOB foram maiores ( $P < 0,05$ ) no grupo selecionado sem antioxidante e nos adicionados de catequina ( $75 \mu\text{M}$ ) ou resveratrol ( $25$  ou  $75 \mu\text{M}$ ) do que no sêmen não selecionado. Com relação à STR, apenas o grupo tratado com catequina ( $75 \mu\text{M}$ ) foi superior ( $P < 0,05$ ) ao do não selecionado. Por outro lado, a ALH foi menor ( $P < 0,05$ ) nos grupos selecionados sem antioxidante e nos tratados com catequina ( $75 \mu\text{M}$ ) ou resveratrol ( $25$  ou  $75 \mu\text{M}$ ), do que no grupo não selecionado. Da mesma forma, o grupo selecionado sem antioxidante apresentou menor ( $P < 0,05$ ) BCF do que o não selecionado (Tabela 3).

Os percentuais de espermatozoides portadores de membrana plasmática íntegra (Tabela 4; Figura 2A), após descongelação, foram superiores ( $P < 0,05$ ) nos grupos selecionados sem antioxidante e naqueles tratados com catequina ( $75 \mu\text{M}$ ), quercetina ( $25 \mu\text{M}$ ) ou resveratrol ( $25$  ou  $75 \mu\text{M}$ ) do que no grupo não selecionado. Por outro lado, o sêmen não selecionado, assim como o selecionado e congelado com quercetina ( $25 \mu\text{M}$ ) determinaram menor ( $P < 0,05$ ) potencial de membrana mitocondrial (Tabela 4; Figura 2B) do que os demais grupos experimentais. O percentual de espermatozoides caprinos com acrossoma intacto (Tabela 4; Figura 2C), morfologicamente normais (Tabela 4; Figura 2D) e sem estresse oxidativo (Tabela 4; Figura 2E) não foram alterados ( $P > 0,05$ ) pelos processos de centrifugação em gradiente de Percoll e de congelação espermática, independente do uso ou não de substâncias antioxidantes.

Com relação à translocação da fosfatidilserina, amostras de sêmen caprino selecionadas e congeladas, com ou sem antioxidantes, apresentaram maior ( $P < 0,05$ ) percentual de células intactas (DCF+/AnV-) do que as não selecionadas e congeladas. No entanto, o número de células apoptóticas (DCF+/AnV+) não diferiu ( $P > 0,05$ ) entre os grupos experimentais após descongelação do sêmen, enquanto que o percentual de células mortas (DCF-/AnV+) foi superior ( $P < 0,05$ ) no grupo não selecionado e congelado do que nos demais grupos (Tabela 4; Figura 2F).

## DISCUSSÃO

A centrifugação do sêmen em gradientes contínuos de densidade de Percoll mostrou ser uma técnica viável para a separação de espermatozoides caprinos, com discreta melhora na qualidade espermática quando realizado na presença de catequina ou resveratrol. Após centrifugação, foram obtidas melhor motilidade progressiva, VSL, LIN, STR e WOB, parâmetros correlacionados positivamente com a taxa de fertilidade (MATOS et al., 2008). Por outro lado, a ALH, que é associado à hiperativação espermática (CANCEL et al., 2000), foi reduzida após centrifugação. Vale ressaltar que a VSL aumentou apenas nos grupos selecionados com catequina (75 µM) ou resveratrol (75 µM), em relação ao não selecionado, o que demonstra o efeito protetor, embora discreto, desses agentes sobre os espermatozoides, conforme anteriormente relatado (SARLÓS et al., 2002; PURDY et al., 2004).

Os resultados de cinética espermática, pós-centrifugação, corroboram com os de estudos anteriores (HOSSEPIAN de LIMA et al., 2000; KOBAYASHI et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2011; LÚCIO et al., 2012) e demonstram a capacidade dos gradientes de Percoll em selecionar espermatozoides com maior competência para se deslocar (OLIVEIRA et al., 2011). Como reflexo disso, após descongelamento do sêmen, foi evidenciada melhor cinética espermática (motilidade progressiva, VSL, VAP, LIN, STR e WOB) nas amostras selecionadas do que nas não selecionadas. Contudo, a STR do sêmen descongelado aumentou apenas no grupo tratado com catequina (75 µM), em relação ao não selecionado, o que evidencia a capacidade deste agente em melhor manter a atividade dos espermatozoides criopreservados (PURDY et al., 2004; BOONSORN et al., 2010).

Com relação à integridade de membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial, integridade de acrossoma e morfologia espermática não foram observadas diferenças entre os grupos não selecionado e selecionados, o que corrobora com relatos anteriores (LEE et al., 2009; RESENDE et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011). Exceção foi observada apenas no grupo da quercetina, que apresentou redução do potencial de membrana mitocondrial destes gametas, em relação a todos os demais grupos experimentais, fato que pode ser atribuído à sua ação como inibidor enzimático (BREITBART et al., 1985). Portanto, assim como observado por GIBB et al. (2013) para o sêmen equino sexado com quercetina em citômetro de fluxo, não houve efeito benéfico dos agentes antioxidantes utilizados sobre os parâmetros descritos.

Por outro lado, para a taxa de recuperação de espermatozoides após centrifugação do sêmen caprino em gradientes contínuos de Percoll, foram evidenciados valores relativamente altos, para todos os grupos experimentais selecionados, com média de 21,99% entre eles. Recuperação espermática semelhante foi obtida por HOSSEPIAN de LIMA et al. (2000) para espermatozoides bovinos sexados em gradientes descontínuos de Percoll (25%). Por outro lado, na maioria dos estudos é relatada taxa de recuperação baixa, variando de 4,12 a 5,7 % (RESENDE et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011; RESENDE et al., 2011; LÚCIO et al., 2012).

O alto percentual de recuperação espermática pode ter sido determinado pelo uso de sêmen *in natura*, ao invés de descongelado, para a centrifugação de amostras de sêmen utilizando gradiente de Percoll. Isso porque, quanto maior o porcentual de células danificadas nas amostras seminais, maior a retenção destes gametas nas camadas superiores do gradiente de densidade de Percoll (OLIVEIRA et al., 2011) e, conseqüentemente, menor a taxa de recuperação. Além disso, o fato da diferença de DNA entre os espermatozoides portadores dos cromossomos X e Y ser elevada na espécie caprina (4,4%) (PARRILLA et al., 2004), em relação à de outras espécies (JOHNSON, 2000; GARNER, 2001), pode ter facilitado a separação das duas populações e a recuperação dos gametas.

Em oposição aos resultados obtidos com o sêmen *in natura*, após descongelação, a integridade de membrana plasmática de espermatozoides caprinos, selecionados em gradientes de Percoll, foi superior a do sêmen não selecionado. Assim, em virtude da integridade de membrana plasmática ser correlacionada positivamente com a fertilidade (LEE et al., 2009), os resultados deste estudo favorecem o uso da técnica de centrifugação em gradientes contínuos de Percoll, sem restrições à congelação espermática. Apenas o grupo selecionado com EGCG (100 µM) não melhorou este parâmetro, em relação ao grupo não selecionado, demonstrando que este agente antioxidante não desempenhou nenhum efeito benéfico sobre os espermatozoides caprinos submetidos à separação e congelação.

Após descongelação, foi evidenciada total inibição do potencial de membrana mitocondrial no sêmen não selecionado, o que demonstra o efeito nocivo da congelação sobre a respiração celular (CÂMARA e GUERRA, 2008), bem como a capacidade de seleção da técnica de separação espermática em gradiente de Percoll (OLIVEIRA et al., 2011). Todavia, a mesma observação foi feita para o sêmen tratado com quercetina,

embora a via de inibição desta, possivelmente, seja diferenciada, uma vez que o efeito inibidor foi gerado mesmo antes da congelação. Essa hipótese é fortalecida pelo fato da quercetina ser um inibidor enzimático e, a partir disso, interferir na atividade mitocondrial (BREITBART et al., 1985). Apesar da inibição mitocondrial, assim como anteriormente relatado (SILVA et al., 2012), a quercetina, intrigantemente, não comprometeu os demais parâmetros espermáticos avaliados neste estudo.

Da mesma forma, como observado nas amostras de sêmen *in natura*, a morfologia espermática não sofreu interferência do processo de congelação, independente de terem sido ou não selecionadas. O mesmo ocorreu para o percentual de células sem estresse oxidativo, fato também constatado por MATÁS et al. (2011), os quais sugerem que a não redução do estresse oxidativo decorra da existência de diferentes rotas de geração de ROS entre os grupos selecionados e não selecionado. Neste contexto, as ROS geradas após centrifugação em gradientes de Percoll decorreriam do estímulo à capacitação, enquanto que no sêmen não centrifugado estas seriam oriundas das células mortas e com resíduo de citoplasma (MATÁS et al., 2011).

A centrifugação dos espermatozoides caprinos em gradientes de Percoll selecionou os gametas a tal ponto que, após descongelação, os grupos selecionados apresentaram maior percentual de células intactas (DCF+/AnV-), do que o não selecionado. Da mesma forma, menor percentual de células mortas (DCF-/AnV+) foi observado nos grupos selecionados, em relação ao não selecionado; embora sem diferenças quanto ao grau de apoptose (DCF+/AnV+). Tais resultados favorecem o uso do gradiente de Percoll, mas tornam ainda mais intrigante o efeito da quercetina sobre a célula espermática, visto que apoptose e perda de potencial de membrana mitocondrial são eventos relacionados (CÂMARA e GUERRA, 2008). Desse modo, é fortalecida a suspeita de que a inibição mitocondrial ocasionada pela quercetina é diferenciada e necessita ser estudada e esclarecida.

Os resultados até então descritos tornam a centrifugação espermática em gradientes contínuos de densidade de Percoll uma técnica atrativa para a espécie caprina. Para estes animais tal metodologia mostrou-se não deletéria aos espermatozoides e compatível com o processo de congelação de sêmen, as quais são exigências do mercado (HOSSEPIAN de LIMA, 2007; HOSSEPIAN de LIMA et al., 2011). Além disso, pelo fato do gradiente usado ter sido contínuo, este pode ser estocado, o que facilita o uso da técnica comercialmente (RESENDE et al., 2010; RESENDE et al., 2011). Entretanto, é necessário

determinar a acuidade da metodologia em separar as populações de espermatozoides caprinos X e Y; fator determinante para sua utilização na sexagem (HOSSEPIAN de LIMA et al., 2011).

Por outro lado, com relação às terapias antioxidantes, apenas a catequina e o resveratrol demonstraram discreto efeito benéfico, o qual foi constatado exclusivamente em relação ao grupo não selecionado. Contudo, vale ressaltar que, apesar do comprovado poder antioxidante (STOJANOVIĆ et al., 2001; SIMOS et al., 2012), os compostos fenólicos atuam de forma diferenciada de acordo com o tipo celular (BIANCH e ANTUNES, 1999). Além disso, estes agentes, com destaque para as catequinas, tornam-se instáveis com o aumento do pH (pH 4 para 8) (ZHU et al., 1997; CHOBOT et al., 2009) e formam complexos estáveis com proteínas como as do leite (ARTS et al., 2002; HASSAN et al., 2013), o que compromete a sua atividade.

Desse modo, as condições experimentais utilizadas neste estudo podem ter comprometido a atividade dos compostos fenólicos usados, em virtude dos meios empregados terem pH variando de 6,8 a 7,4 e o diluidor de congelação ser à base de leite desnatado. Assim, é possível que, na ausência destas condições, os antioxidantes estudados, principalmente a catequina, expressem ação protetora sobre os espermatozoides, sendo interessante a realização de estudos em sistemas que permitam maiores modificações das condições de trabalho. Com base nisto, pode ser interessante o uso desses polifenóis na sexagem de amostras de sêmen por citometria de fluxo, visto que na centrifugação em gradientes de densidade de Percoll o pH é um fator determinante para o sucesso da técnica, o que impede grandes modificações deste parâmetro.

## **CONCLUSÃO**

A centrifugação de espermatozoides em gradiente contínuo de densidade de Percoll é uma metodologia viável para a espécie caprina, que permite selecionar espermatozoides com melhor cinética. Além disso, é compatível com o processo de congelação, por possibilitar a melhor manutenção da cinética e da integridade da membrana plasmática de espermatozoides caprinos após descongelação. Entretanto, a qualidade do sêmen selecionado em gradientes de densidade não é melhorada pelo uso das terapias com polifenóis.



## AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro, bem como à Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO).

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, G.P.; ALVAREZ, R.H. Métodos de separação de espermatozoides para escolha do sexo dos animais domésticos. **Boletim de Indústria Animal**, v. 60, n. 1, p. 107-115, 2003.

ANDERSEN, C.Y.; BYSKOV, A.G. Enhanced separation of X and Y bearing sperm cells by a combined density gradient centrifugation evaluated by fluorescence in situ hybridization of the Y-chromosome. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 76, n. 2, p. 131-134, 1997.

ARTS, M.J.T.J.; HAENEN, G.R.M.M.; WILMS, L.C.; BEETSTRA, S.A.J.N.; HEIJNEN, C.G.M.; VOSS, H.-P.; BAST, A. interactions between flavonoids and proteins: effect on the total antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 5, p. 1184-1187, 2002.

BANSAL, A.K.; BILASPURIG.S. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, p. 1-7, 2011.

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.

BATHGATE, R.; MACE, N.; HEASMAN, K.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C.; GRAAF, S.P. Birth of kids after artificial insemination with sex-sorted, frozen-thawed goat spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, p. 893-898, 2013.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta (Free radicals and the main dietary antioxidants). **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BOONSORN, T., KONGBUNTAD, W.; NARKKONG, N.-A.; AENGWANICH, W. Effects of catechin addition to extender on sperm quality and lipid peroxidation in boar semen. **American-Eurasian journal of agricultural and environmental**, v. 7, n. 3, p. 283-288, 2010.

BREITBART, H.; RUBINSTEINAN, S.; NASS-ARDEN, L. The role of calcium and  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in maintaining motility in ram spermatozoa. **The Journal of Biological Chemistry**, n.260, n. 21, p. 11548-11553, 1985.

CÂMARA, D.R.; GUERRA, M.M.P. Mitocôndria espermática: além da síntese de adenosina trifosfato (ATP). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, p. 93-99, 2008.

CANCEL, A.M.; LOBDELL, D.; MENDOLA, P.; PERREAULT, S.D. Objective evaluation of hyperactivated motility in rat spermatozoa using computer-assisted sperm analysis. **Human Reproduction**, v. 15, n. 6, p. 1322-1328, 2000.

CHOBOT, V.; HUBER, C.; TRETENHAHN, G.; HADACEK, F. ( $\pm$ )-Catechin: Chemical weapon, antioxidant, or stress regulator?. **Journal of Chemical Ecology**. v. 35, p. 980-996, 2009.

CHUNMEI, X.; WEI, X.; SHENG, Y.; LEI, A., XIHE, L.; ZHONGHONG, W.; JIAXING, Z.; ZHUQING, W.; JIANHUI, T. Effect of antioxidant supplementation on function and fertility of sex-sorted boar spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 136, p. 108-114, 2012.

EVANS, G.; HOLLINSHEAD, F.K.; MAXWELL, W.M.C. Preservation and artificial insemination of sexed semen in sheep. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, p. 455-464, 2004.

GARNER, D.L. Sex-sorting mammalian sperm: concept to application in animals. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 4, p. 519-526, 2001.

GIBB, Z.; BUTLER, T.J.; MORRIS, L.H.A.; MAXWELL, W.M.C.; GRUPEN, C.G. Quercetin improves the postthaw characteristics of cryopreserved sex-sorted and nonsorted stallion sperm. **Theriogenology**, v. 79, n. 6, p. 1001-1009, 2013.

HASSAN, Z.M.R.; DIN, H.M.F.E.; ALI, A.A.; MEHANNA, N.S.; EL-MESSERY, T.M. Interaction of some low molecular weight phenolics with milk proteins. **World Applied Sciences Journal**, v. 23, n. 2, p. 182-187, 2013.

HOSSEPIAN de LIMA, V.F.M.; MOREIRA-FILHO, C.A.; LUCIO, A.C.; RESENDE, M.V. Sexagem de espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente descontínuo de densidade de Percoll. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 8, p. 1680-1685, 2011.

HOSSEPIAN de LIMA, V.F.M. Avanços metodológicos na seleção do sexo de espermatozoides bovinos para utilização no melhoramento genético e na produção animal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 219-228, 2007.

HOSSEPIAN de LIMA, V.F.M.; MOREIRA-FILHO, C.A.; RAMALHO, M.F.P.D.-T. Processo de seleção do sexo de espermatozoides em mamíferos e métodos de controle de qualidade de doses de “sêmen sexado” congelado. **BR PI 0300604-2**, 17 Jun. 2003.

HOSSEPIAN de LIMA, V.F.M.; RAMALHO, M.D.T.; RODRIGUES, L.H.; MALHEIROS, E.B.; MOREIRA-FILHO, C.A. Separation of X- and Y-bearing bovine spermatozoa by Percoll density gradient centrifugation. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 480, 2000.

JOHNSON, L.A. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 93-107, 2000.

KANESHARATNAM, N.; ESWARAMOHAN, T.; BALASUBRAMANIAM, K. Fractionation of X and Y chromosome-bearing bovine spermatozoa through sugar gradients for sex predetermination in dairy cattle. **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, v. 2, n. 3, p. 203-206, 2012.

KLINC, P.; FRESE, D.; OSMERS, H.; RATH, D. Insemination with sex sorted fresh bovine spermatozoa processed in the presence of antioxidative substances. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 1, p. 58-62, 2007.

KLINC, P.; RATH, D. Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 1, p. 63-67, 2007.

KOBAYASHI, J.; OGURO, H.; UCHIDA, H.; KOHSAKA, T.; SASADA, H.; SATO, E. Assessment of bovine X- and Y-bearing spermatozoa in fractions by discontinuous Percoll gradients with rapid fluorescence *in situ* hybridization. **Journal of Reproduction and Development**, v. 50, n. 4, 2004.

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

LEE, H.-L.; KIM, S.-H.; JI, D.-B.; KIM, Y.-J. A comparative study of Sephadex, glass wool and Percoll separation techniques on sperm quality and IVF results for cryopreserved bovine semen. **Journal of Veterinary Science**, v. 10, n. 3, p. 249-255, 2009.

LI, F.; GONG, Q.; DONG, H.; SHI, J. Resveratrol, a neuroprotective supplement for alzheimer's disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, p. 27-33, 2012.

LUCIO, A.C.; RESENDE, M.V.; DERNOWSECK-MEIRELLES, J.A.; PERINI, A.P.; OLIVEIRA, L.Z.; MIGUEL, M.C.V.; CARMO, A.S.; TOMITA, S.Y.; ALVES, B.C.A.; FAZANO, F.A.T.; LIMA, V.F.M.H. Assessment of swim-up and discontinuous density gradient in sperm sex preselection for bovine embryo production. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 3, p. 525-532, 2012.

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.

MARTÍ, E.; PÉ REZ-PÉ, R.; MUIÑO-BLANCO, T.M.; CEBRIÁ N-PÉREZ, J.A. Comparative Study of Four Different Sperm Washing Methods Using Apoptotic Markers in Ram Spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 27, n. 6, p. 746-753, 2006.

MATÁS, C.; VIEIRA, L.; GARCÍA-VÁZQUEZ, F.A.; AVILÉS-LÓPEZ, K.; LÓPEZ-ÚBEDA, R.; CARVAJAL, J.A.; GADEA, J. Effects of centrifugation through three different discontinuous Percoll gradients on boar sperm function. **Animal Reproduction Science**, v. 127, n. 1-2, p.:62-72, 2011.

MATOS, D.L.; ARAÚJO, A.A.; ROBERTO, I.G.; TONIOLLI, R. Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 4, p. 225-232, 2008.

OLIVEIRA, M.E.F.; TEIXEIRA, P.P.M.; VICENTE, W.R.R. **Biotécnicas reprodutivas em ovinos e caprinos**. 1ª Ed. São Paulo: Med Vet, 2013. 305 p.

OLIVEIRA, L.Z.; ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.; de ANDRADE, A.F.; PERINI, A.P.; RESENDE, M.V.; MIGUEL, M.C.; LUCIO, A.C.; HOSSEPIAN de LIMA, V.F. Effects of discontinuous Percoll gradient centrifugation on the quality of bovine spermatozoa evaluated with computer-assisted semen analysis and fluorescent probes association. **Andrologia**, v. 44, n. 1, p. 9-15, 2012.

OLIVEIRA, L.Z.; ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ANDRADE, A.F.C.; HOSSEPIAN de LIMA, V.F.M. Taxa de recuperação e características espermáticas após a sexagem por centrifugação em gradiente de densidade em espermatozoides descongelados. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 1, p. 41-48, 2011.

PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J.M.; ROCA, J.; MARTINEZ, E.A. Flow cytometry identification of X- and Y-chromosome-bearing goat spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, p. 58-60, 2004.

PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability and cryopreservation. **Micron**, v. 37, p. 597-612, 2006.

PURDY, P.H. ; ERICSSON, S.A.; DODSON, R.E.; STERNES, K.L.; GARNER, D.L. Effects of the flavonoids, silibinin and catechin, on the motility of extended cooled caprine sperm. **Small Ruminant Research**, v. 55, p. 239-243, 2004.

RAHMAN, A.N.Md.A.; ABDULLAH, R.B.; KHADIJAH, W.E.W. A review of reproductive biotechnologies and their application in goat. **Biotechnology**, v.7, n. 2, p. 371-384, 2008.

RESENDE, M.V.; LUCIO, A.C.; PERINI, A.P.; OLIVEIRA, L.Z.; ALMEIDA, A.O.; ALVES, B.C.A.; MOREIRA-FILHO, C.A.; SANTOS, I.W.; HOSSEPIAN de LIMA, V.F.M. Comparative validation using quantitative real-time PCR (qPCR) and conventional PCR of bovine semen centrifuged in continuous density gradient. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 3, p. 544-551, 2011.

RESENDE, M.V.; LÚCIO, A.C.; PERINI, A.P.; OLIVEIRA, L.Z.; ALMEIDA, A.O.; GUSMÃO, A.L.; LIMA, V.F.M.H. Desvio da proporção de sexo e integridade do DNA dos espermatozoides bovinos centrifugados em gradientes de densidade contínuos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 11, n. 1, p. 260-269, 2010.

RESENDE, M.V.; BEZERRA, M.B.; PERECIN, F.; ALMEIDA, A.O.; LUCIO, A.C.; HOSSEPIAN de LIMA, V.F.M. Separation of X-bearing bovine sperm by centrifugation in continuous Percoll and optiprep density gradient: effect in sperm viability and *in vitro* embryo production. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 581-587, 2009.

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.

SARLÓS, P.; MOLNÁR, A.; KÓKAI, M.; GÁBOR, G.; RÁTKY, J. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 50, p. 235- 45, 2002.

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

SILVA, S.V., SOARES, A.T., BATISTA, A.M., ALMEIDA, F.C., NUNES, J.F., PEIXOTO, C.A., GUERRA, M.M.P. 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.

SIMOS, Y.V.; VERGINADIS, I.I.; TOLIOPOULOS, I.K.; VELALOPOULOU, A.P.; KARAGOUNIS, I.V.; KARKABOUNAS, S.C.; M EVANGELOU, A.M. Effects of catechin and epicatechin on superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity, in vivo. **Redox Report**, v. 17, n. 5, p. 181-186, 2012.

SRISOMBUT, C.; WONGKULARB, A.; CHINSOMBOON, S.; SANGTONG, S.; CHATASINGH, S. Sperm separation technique using iodixanol compare to percoll gradient. **Thai Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 13, n. 2, p. 105-110, 2001.

STOJANOVIĆ, S.; SPRINZ, H.; BREDE, O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 391, n. 1, p. 79-89, 2001.

SUREKA, P.; NILANI, K.; ESWARAMOHAN, T.; BALASUBRAMANIAM, K. Sex Pre-selection by Quantification of Y-Chromosome bearing spermatozoa in goat sperm. **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 3, n. 1, 2013.

VAN MUNSTER, E.B.; STAP, J.; HOEBE, R.A.; te MEERMAN, G.J.; ATEN, J.A. Difference in sperm head volume as a theoretical basis for sorting X- and Y-bearing spermatozoa: potentials and limitations. **Theriogenology**, v. 52, p.1281-1293, 1999.

WANG, H.-X.; FLAHERTY, S.P.; SWANN, N.J.; MATTHEWS, C.D. Genetics: Discontinuous Percoll gradients enrich X-bearing human spermatozoa: a study using double-label fluorescence int-situ hybridization. **Human Reproduction**, v. 9, n. 7, p. 1265-1270, 1994.

ZHU, Q.Y.; ZHANG, A.; TSANG, D.; HUANG, Y.; CHEN, Z. Stability of green tea catechins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 4624-4628, 1997.

**Tabela 1** - Parâmetros cinéticos (Média  $\pm$  DP) de amostras de sêmen caprino *in natura* não selecionadas ou selecionadas em gradientes contínuos de densidade de Percoll, adicionados ou não de antioxidantes

	NS	S	SC75	SE100	SQ25	SR25	SR75
MT (%)	86,3 $\pm$ 4,5	83,9 $\pm$ 6,2	89,2 $\pm$ 7,8	88,8 $\pm$ 5,1	83,8 $\pm$ 8,2	84,4 $\pm$ 5,5	84,6 $\pm$ 7,2
MP (%)	41,1 $\pm$ 4,6 <sup>a</sup>	63,8 $\pm$ 11,7 <sup>b</sup>	73,2 $\pm$ 9,8 <sup>b</sup>	66,3 $\pm$ 5,8 <sup>b</sup>	67,5 $\pm$ 7,9 <sup>b</sup>	66,4 $\pm$ 5,4 <sup>b</sup>	67,6 $\pm$ 7,5 <sup>b</sup>
VCL ( $\mu$ m/s)	132,8 $\pm$ 12,5	125,2 $\pm$ 22,6	139,3 $\pm$ 10,8	130,6 $\pm$ 13,9	132,8 $\pm$ 22,0	134,1 $\pm$ 15,7	138,5 $\pm$ 11,8
VSL ( $\mu$ m/s)	87,9 $\pm$ 14,8 <sup>a</sup>	110,7 $\pm$ 24,6 <sup>ab</sup>	123,4 $\pm$ 9,7 <sup>b</sup>	115,0 $\pm$ 12,6 <sup>ab</sup>	117,7 $\pm$ 22,5 <sup>ab</sup>	119,2 $\pm$ 16,9 <sup>ab</sup>	122,2 $\pm$ 11,5 <sup>b</sup>
VAP ( $\mu$ m/s)	113,3 $\pm$ 15,9	119,3 $\pm$ 23,6	133,5 $\pm$ 10,8	125,4 $\pm$ 14,2	126,8 $\pm$ 23,1	128,7 $\pm$ 16,5	133,2 $\pm$ 11,3
LIN (%)	65,8 $\pm$ 4,9 <sup>a</sup>	88,0 $\pm$ 4,3 <sup>b</sup>	88,7 $\pm$ 3,8 <sup>b</sup>	88,0 $\pm$ 2,8 <sup>b</sup>	88,4 $\pm$ 3,5 <sup>b</sup>	88,7 $\pm$ 3,3 <sup>b</sup>	88,3 $\pm$ 2,7 <sup>b</sup>
STR (%)	77,3 $\pm$ 2,3 <sup>a</sup>	92,5 $\pm$ 3,0 <sup>b</sup>	92,5 $\pm$ 3,0 <sup>b</sup>	91,8 $\pm$ 1,9 <sup>b</sup>	92,8 $\pm$ 1,8 <sup>b</sup>	92,5 $\pm$ 2,6 <sup>b</sup>	91,7 $\pm$ 2,3 <sup>b</sup>
WOB (%)	85,1 $\pm$ 3,9 <sup>a</sup>	95,1 $\pm$ 1,8 <sup>b</sup>	95,8 $\pm$ 1,5 <sup>b</sup>	95,9 $\pm$ 1,4 <sup>b</sup>	95,3 $\pm$ 2,2 <sup>b</sup>	95,9 $\pm$ 1,13 <sup>b</sup>	96,2 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>
ALH ( $\mu$ m)	2,8 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	1,8 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	1,8 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	1,8 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	1,8 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	1,8 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	1,8 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>
BCF (Hz)	8,1 $\pm$ 0,2	8,2 $\pm$ 1,1	8,3 $\pm$ 0,3	8,3 $\pm$ 0,5	8,3 $\pm$ 0,4	8,5 $\pm$ 0,5	8,4 $\pm$ 0,8

Letras diferentes na mesma linha demonstram diferença entre os grupos ( $P < 0,05$ ). NS: não selecionado; S: selecionado; SC75: selecionado com catequina 75  $\mu$ M; SE100: selecionado com EGCG 100  $\mu$ M; SQ25: selecionado com quercetina 25  $\mu$ M; SR25: selecionado com resveratrol 25  $\mu$ M; SR75: selecionado com resveratrol 75  $\mu$ M. MT: motilidade total; MP: motilidade progressiva; VCL: velocidade curvilínea; VSL: velocidade linear progressiva; VAP: velocidade média da trajetória; LIN: linearidade; STR: retilinearidade; WOB: oscilação; ALH: amplitude de deslocamento lateral de cabeça; BCF: frequência de batimento flagelar cruzado.

**Tabela 2** - Integridade de membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial, integridade de acrossomal, morfologia espermática e taxa de recuperação espermática (Média  $\pm$  DP) de amostras de sêmen caprino *in natura* não selecionadas ou selecionadas em gradientes contínuos de densidade de Percoll, adicionados ou não de antioxidantes

	NS	S	SC75	SE100	SQ25	SR25	SR75
iMP (%)	79,1 $\pm$ 6,1	83,7 $\pm$ 5,3	76,0 $\pm$ 12,8	80,9 $\pm$ 9,7	84,8 $\pm$ 4,0	85,3 $\pm$ 6,9	82,1 $\pm$ 4,4
aPMM (%)	86,5 $\pm$ 10,4 <sup>a</sup>	93,0 $\pm$ 5,0 <sup>a</sup>	91,8 $\pm$ 4,4 <sup>a</sup>	82,8 $\pm$ 5,8 <sup>a</sup>	0,8 $\pm$ 2,0 <sup>b</sup>	88,9 $\pm$ 4,4 <sup>a</sup>	80,0 $\pm$ 4,1 <sup>a</sup>
iAC (%)	74,6 $\pm$ 13,3	58,3 $\pm$ 7,0	62,0 $\pm$ 6,6	58,3 $\pm$ 9,9	69,9 $\pm$ 10,7	68,2 $\pm$ 14,8	63,5 $\pm$ 6,8
nMOR (%)	88,8 $\pm$ 4,5	95,3 $\pm$ 4,2	95,3 $\pm$ 4,54	95,4 $\pm$ 4,4	94,6 $\pm$ 4,8	94,8 $\pm$ 5,6	95,7 $\pm$ 4,8
Tr (%)	100,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	26,3 $\pm$ 7,8 <sup>b</sup>	20,2 $\pm$ 9,0 <sup>b</sup>	20,3 $\pm$ 17,0 <sup>b</sup>	15,2 $\pm$ 10,0 <sup>b</sup>	27,3 $\pm$ 10,5 <sup>b</sup>	22,6 $\pm$ 12,8 <sup>b</sup>

Letras diferentes na mesma linha demonstram diferença entre os grupos ( $P < 0,05$ ). NS: não selecionado; S: selecionado; SC75: selecionado com catequina 75  $\mu$ M; SE100: selecionado com EGCG 100  $\mu$ M; SQ25: selecionado com quercetina 25  $\mu$ M; SR25: selecionado com resveratrol 25  $\mu$ M; SR75: selecionado com resveratrol 75  $\mu$ M. iMP: integridade de membrana plasmática; aPMM: alto potencial de membrana mitocondrial; iAC: integridade de acrossoma; nMOR: morfologia normal; Tr: taxa de recuperação espermática.



**Tabela 3** - Parâmetros cinéticos (Média  $\pm$  DP), após descongelação, de amostras de sêmen caprino não selecionadas ou selecionadas em gradientes contínuos de densidade de Percoll, adicionados ou não de antioxidantes, e congeladas em diluidor à base de leite desnatado (7% glicerol), na presença ou não destes agentes

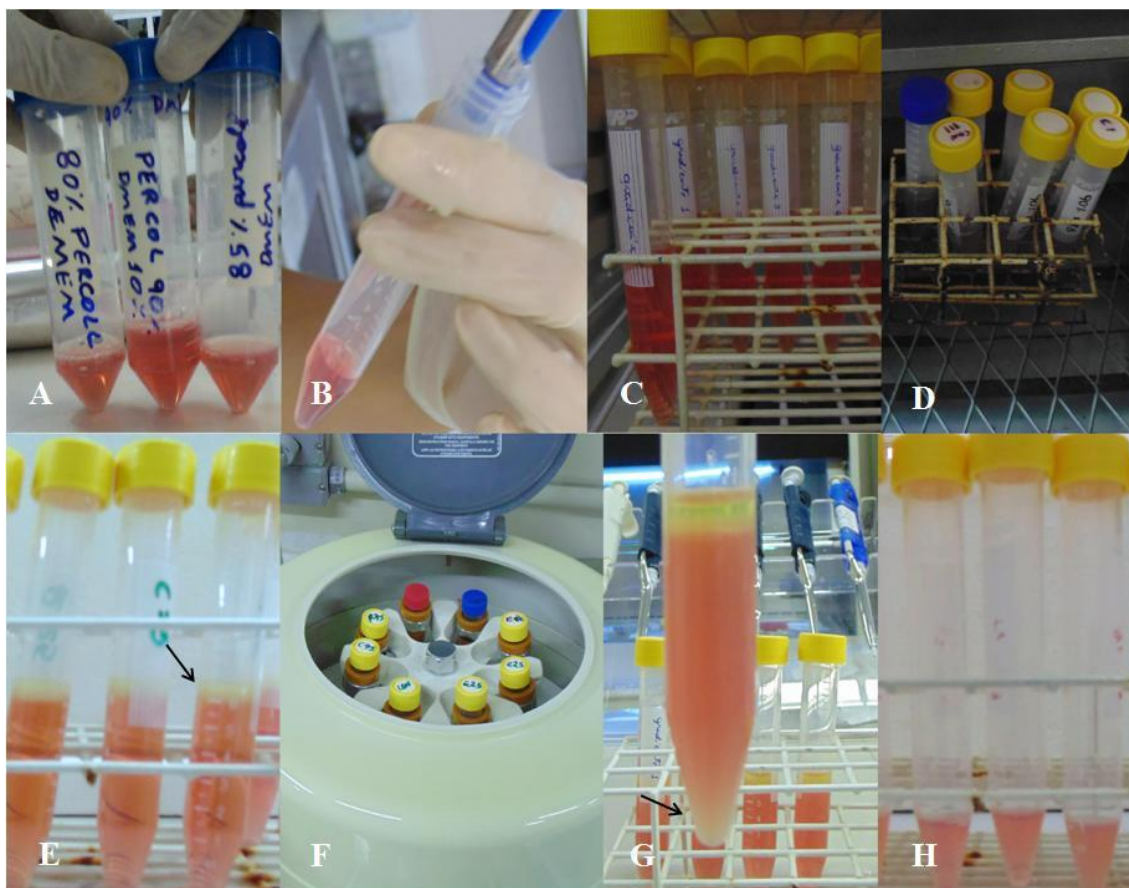
	NSc	Sc	SC75c	SE100c	SQ25c	SR25c	SR75c
MT (%)	41,6 $\pm$ 20,3	66,1 $\pm$ 12,8	63,6 $\pm$ 13,0	59,7 $\pm$ 15,8	58,9 $\pm$ 13,5	60,7 $\pm$ 13,5	57,9 $\pm$ 12,7
MP (%)	17,3 $\pm$ 11,9 <sup>a</sup>	40,9 $\pm$ 7,4 <sup>b</sup>	43,1 $\pm$ 11,9 <sup>b</sup>	35,7 $\pm$ 13,0 <sup>b</sup>	35,9 $\pm$ 10,7 <sup>b</sup>	37,6 $\pm$ 6,0 <sup>b</sup>	36,6 $\pm$ 5,6 <sup>b</sup>
VCL ( $\mu$ m/s)	69,1 $\pm$ 21,1	91,2 $\pm$ 13,2	90,2 $\pm$ 11,9	73,9 $\pm$ 6,0	76,8 $\pm$ 11,6	85,2 $\pm$ 9,6	85,7 $\pm$ 8,5
VSL ( $\mu$ m/s)	44,7 $\pm$ 23,1 <sup>a</sup>	75,1 $\pm$ 16,9 <sup>b</sup>	76,0 $\pm$ 13,1 <sup>b</sup>	57,3 $\pm$ 5,5 <sup>ab</sup>	60,5 $\pm$ 12,4 <sup>ab</sup>	70,1 $\pm$ 15,6 <sup>ab</sup>	70,3 $\pm$ 9,7 <sup>ab</sup>
VAP ( $\mu$ m/s)	54,4 $\pm$ 24,1 <sup>a</sup>	83,9 $\pm$ 15,1 <sup>b</sup>	83,3 $\pm$ 12,9 <sup>b</sup>	63,9 $\pm$ 6,6 <sup>ab</sup>	67,8 $\pm$ 12,6 <sup>ab</sup>	77,4 $\pm$ 12,8 <sup>ab</sup>	78,2 $\pm$ 9,3 <sup>ab</sup>
LIN (%)	62,0 $\pm$ 14,6 <sup>a</sup>	81,7 $\pm$ 8,5 <sup>b</sup>	84,0 $\pm$ 4,7 <sup>b</sup>	77,6 $\pm$ 3,8 <sup>ab</sup>	78,3 $\pm$ 6,4 <sup>ab</sup>	81,4 $\pm$ 9,5 <sup>b</sup>	81,9 $\pm$ 4,9 <sup>b</sup>
STR (%)	80,9 $\pm$ 8,1 <sup>a</sup>	89,0 $\pm$ 5,4 <sup>ab</sup>	91,0 $\pm$ 2,8 <sup>b</sup>	89,8 $\pm$ 2,3 <sup>ab</sup>	89,0 $\pm$ 3,2 <sup>ab</sup>	89,7 $\pm$ 5,5 <sup>ab</sup>	89,8 $\pm$ 2,7 <sup>ab</sup>
WOB (%)	76,1 $\pm$ 11,4 <sup>a</sup>	91,6 $\pm$ 4,2 <sup>b</sup>	92,2 $\pm$ 2,6 <sup>b</sup>	86,4 $\pm$ 4,0 <sup>ab</sup>	87,9 $\pm$ 5,1 <sup>ab</sup>	90,4 $\pm$ 5,29 <sup>b</sup>	91,2 $\pm$ 2,9 <sup>b</sup>
ALH ( $\mu$ m)	2,4 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	1,8 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	1,8 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	2,0 $\pm$ 0,2 <sup>ab</sup>	1,9 $\pm$ 0,2 <sup>ab</sup>	1,8 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	1,8 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup>
BCF (Hz)	10,5 $\pm$ 2,6 <sup>a</sup>	7,7 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>	8,3 $\pm$ 0,9 <sup>ab</sup>	9,4 $\pm$ 2,3 <sup>ab</sup>	8,8 $\pm$ 1,6 <sup>ab</sup>	8,0 $\pm$ 0,3 <sup>ab</sup>	7,9 $\pm$ 0,3 <sup>ab</sup>

Letras diferentes na mesma linha demonstram diferença entre os grupos ( $P < 0,05$ ). NSc: não selecionado e congelado; Sc: selecionado e congelado; SC75c: selecionado e congelado com catequina 75  $\mu$ M; SE100c: selecionado e congelado com EGCG 100  $\mu$ M; SQ25c: selecionado e congelado com quercetina 25  $\mu$ M; SR25c: selecionado e congelado com resveratrol 25  $\mu$ M; SR75c: selecionado com e congelado resveratrol 75  $\mu$ M. MT: motilidade total; MP: motilidade progressiva; VCL: velocidade curvilínea; VSL: velocidade linear progressiva; VAP: velocidade média da trajetória; LIN: linearidade; STR: retilinearidade; WOB: oscilação; ALH: amplitude de deslocamento lateral de cabeça; BCF: frequência de batimento flagelar cruzado.

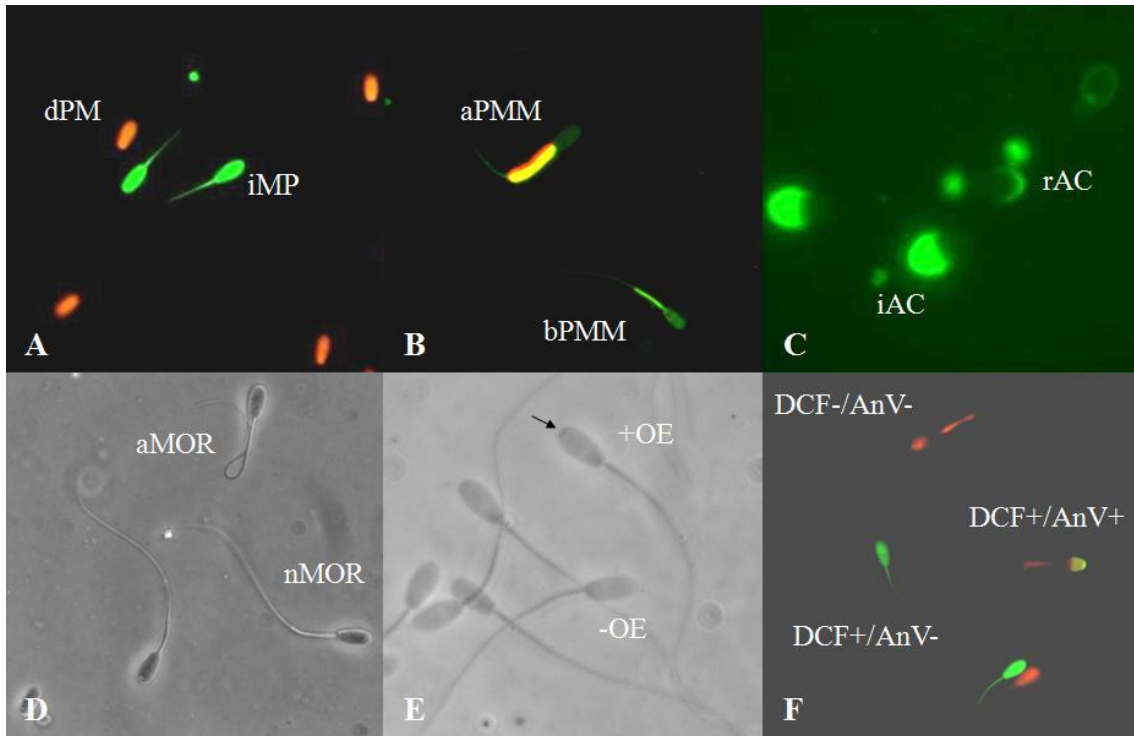
**Tabela 4** - Integridade de membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial, integridade de acrossomal, morfologia espermática e taxa de recuperação (Média ± DP), após descongelamento, de amostras de sêmen caprino não selecionadas ou selecionadas em gradientes contínuos de densidade de Percoll, adicionados ou não de antioxidantes, e congeladas em diluidor à base de leite desnatado (7% glicerol), na presença ou não destes agentes

	NSc	Sc	SC75c	SE100c	SQ25c	SR25c	SR75c
iMP	19,3±5,7 <sup>a</sup>	42,0±11,5 <sup>b</sup>	44,7±4,6 <sup>b</sup>	35,1±8,0 <sup>ab</sup>	40,0±9,3 <sup>b</sup>	43,3±10,1 <sup>b</sup>	48,1±14,8 <sup>b</sup>
aPMM	0,0±0,0 <sup>a</sup>	53,2±17,2 <sup>b</sup>	52,3±10,1 <sup>b</sup>	49,6±15,5 <sup>b</sup>	0,3±0,6 <sup>a</sup>	49,3±8,5 <sup>b</sup>	39,7±12,4 <sup>b</sup>
iAC	44,3±6,2	40,8±7,5	45,2±12,3	46,8±14,9	48,2±11,3	46,3±8,3	54,1±11,3
nMOR	95,6±3,3	92,7±5,4	93,8±4,3	91,8±5,2	92,8±2,7	90,6±3,1	91,2±6,4
-EO	73,8±7,7	81,8±8,5	77,5±9,2	82,3±7,6	83,0±5,9	83±2±8,5	80,0±4,1
DCF+/AnV-	35,0±4,9 <sup>a</sup>	54,3±5,1 <sup>b</sup>	56,3±8,6 <sup>b</sup>	55,9±9,0 <sup>b</sup>	55,2±5,8 <sup>b</sup>	59,3±9,3 <sup>b</sup>	58,9±8,5 <sup>b</sup>
DCF+/AnV+	16,8±2,8	18,3±7,0	21,8±3,7	22,9±5,2	19,8±3,8	18,3±7,1	18,8±7,0
DCF-/AnV+	48,3±3,9 <sup>b</sup>	27,4±7,4 <sup>a</sup>	25,2±5,1 <sup>a</sup>	21,1±10,2 <sup>a</sup>	25,2±5,8 <sup>a</sup>	22,5±7,3 <sup>a</sup>	23,0±7,3 <sup>a</sup>

Letras diferentes na mesma linha demonstram diferença entre os grupos (P<0,05). NSc: não selecionado e congelado; Sc: selecionado e congelado; SC75c: selecionado e congelado com catequina 75 µM; SE100c: selecionado e congelado com EGCG 100 µM; SQ25c: selecionado e congelado com quercetina 25 µM; SR25c: selecionado e congelado com resveratrol 25 µM; SR75c: selecionado com e congelado resveratrol 75 µM. iMP: integridade de membrana plasmática; aPMM: alto potencial de membrana mitocondrial; iAC: integridade de acrossoma; nMOR: morfologia normal; -EO: estresse oxidativo negativo; DCF+/AnV-: célula intacta; DCF+/AnV+: célula apoptótica; DCF-/AnV+: célula morta.



**Figura 1** - Esquemática do processo de preparação dos gradientes contínuos de densidade de Percoll e da centrifugação do sêmen nos mesmos. (A) soluções isotônicas de Percoll; (B) montagem dos gradientes de densidade; (C) refrigeração (5 °C) dos gradientes de densidade; (D) aquecimento (37 °C) dos gradientes de densidade; (E) deposição de alíquotas de sêmen sobre os gradientes; (F) centrifugação; (G) formação do pellet de espermatozoides; (H) recuperação dos espermatozoides sedimentados.



**Figura 2** - Análise microscópica dos espermatozoides. (A) Integridade da membrana plasmática: membrana plasmática íntegra (iMP) e danificada (dMP); (B) Potencial de membrana mitocondrial: alto (aPMM) e baixo potencial de membrana mitocondrial (bPMM); (C) Integridade de acrossoma: acrossoma intacto (ACi) e reagido (ACr); (D) Morfologia espermática: espermatozoide morfologicamente normal (nMOR) e anormal (aMOR); (E) Estresse oxidativo: espermatozoide sem estresse oxidativo (-EO) e com estresse oxidativo (+EO); (F) Translocação da fosfatidilserina: DCF+/AnV-: célula intacta; DCF+/AnV+: célula apoptótica; DCF-/AnV+: célula morta.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, o uso de diferentes concentrações dos polifenóis (+)-catequina, (-)-epigallocatequina galato, resveratrol e quercetina reduziu a cinética espermática, em um efeito dose dependente. Entretanto, isso ocorreu de modo transitório ao longo do tempo de incubação. Além disso, apesar de sem diferença estatística, a EGCG demonstrou forte tendência em melhor preservar a integridade da membrana plasmática de espermatozoides caprinos submetidos à congelação; parâmetro que é correlacionado positivamente com a taxa de fertilidade.

A separação espermática em gradiente contínuo de densidade de Percoll se mostrou uma metodologia viável para a espécie caprina e compatível com o processo de congelação; sobretudo quando na presença de catequina ou de resveratrol. Tais achados demonstram o potencial dos antioxidantes fenólicos em proteger os espermatozoides caprinos durante os processos de centrifugação em gradientes de Percoll e/ou congelação, mesmo diante das condições adversas presentes neste estudo (composição do meio, pH e tensão de oxigênio). Assim, é evidente a necessidade de realizar novos estudos com estes agentes, na ausência de fatores que comprometam sua atividade, a fim de verificar seu real papel sobre os espermatozoides caprinos submetidos aos processos de centrifugação em gradiente de Percoll e/ou congelação.