

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL E SAÚDE ANIMAL

**AVALIAÇÃO IN VITRO DO SÊMEN BOVINO SUPLEMENTADO COM QUERCETINA,
ALBUMINA E PLURONIC® F-127**

BRUNA LETÍCIA SILVA

UMUARAMA - PR

MAIO/2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL E SAÚDE ANIMAL

**AVALIAÇÃO IN VITRO DO SÊMEN BOVINO SUPLEMENTADO COM QUERCETINA,
ALBUMINA E PLURONIC® F-127**

Nível: Mestrado

Área de concentração: Produção Sustentável

Autora: Bruna Letícia Silva

Orientador: Prof. Dr. Antonio Campanha Martinez

Co-Orientador: Prof. Dr. Flávio Augusto Vicente Seixas

Dissertação apresentada como parte das exigências ao Programa de Pós-graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal da Universidade Estadual de Maringá para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

UMUARAMA - PR

MAIO/2023

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

S586a

Silva, Bruna Leticia

Avaliação in vitro do sêmen bovino suplementado com quercetina, albumina e pluronic® F-127 / Bruna Leticia Silva. -- Umuarama, PR, 2023.
49 f.: il., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Campanha Martinez.

Coorientador: Prof. Dr. Flávio Augusto Vicente Seixas.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal, 2023.

1. Criopreservação. 2. Bovinos - Fertilidade. 3. Touros zebuínos. I. Martinez, Antonio Campanha, orient. II. Seixas, Flávio Augusto Vicente, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Medicina Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal. IV. Título.

CDD 23.ed. 636

Márcia Regina Paiva - CRB-9/1267



REVISTA
**CONTRIBUCIONES
A LAS CIENCIAS
SOCIALES**

Contribuciones a Las Ciencias Sociales

Carta de Aceite

A Revista Contribuciones a Las Ciencias Sociales ISSN 1988-7833 declara para os devidos fins, que o artigo intitulado “**Avaliação in vitro do sêmen bovino suplementado com Quercetina, Albumina e Pluronic® F-127**” de autoria de *Bruna Leticia Silva, Adalgiza Pinto Neto, Jefferson Gandra, Flávio Augusto Vicente Seixas, Antonio Campanha Martinez*, foi aceito para publicação.

Por ser a expressão da verdade, firmamos a presente declaração.

São José dos Pinhais, 25 de Julho de 2023.

Equipe editorial

FOLHA DE APROVAÇÃO

Bruna Leticia Silva

Avaliação in vitro de sêmen bovino suplementado
com quercetina, albumina e pluronic F-127

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Veterinária pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA


Prof. Dr. Antonio Campanha Martinez (Presidente)

Universidade Estadual de Maringá


Prof. Dra. Adalgiza Pinto Neto (Membro)

Universidade da Fronteira Sul

Prof. Dr. Jefferson Rodrigues Gandra (Membro)

Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará

Forma remota

Aprovada em: 26 de maio de 2023.

Local da defesa: de forma híbrida.

DEDICATÓRIA

À minha família, Renata Andressa Silva, Maria Aparecida Nascimento Silva e José Oscar Silva, pelo carinho, apoio e por sempre se fazerem presentes, mesmo com a distância. Ao meu namorado, André Luiz Senhorin, por ser minha base e me motivar nos momentos de dificuldades.

DEDICO A VOCÊS MAIS ESTA CONQUISTA!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelas bênçãos alcançadas e por ser tão misericordioso comigo, e aos que me cercam,

Aos meus pais, pelo apoio, preocupação e amor incondicional. Sou muito grata por tudo que fizeram por mim, afinal sem as orientações de vocês não teria chegado tão longe,

À minha irmã, que sempre foi minha melhor amiga e esteve comigo em todos os momentos,

Ao meu namorado, que acompanhou de perto todas as dificuldades vivenciadas durante o mestrado, e que sempre me motivou não desistir, sem sua presença essa etapa da minha vida teria sido muito mais difícil,

Ao Professor Dr. Flávio Seixas, meu coorientador, do Laboratório de Bioquímica Estrutural do departamento de Bioquímica da UEM - Campus CTC, e a a Professora Dr^a. Elisângela Andrade Ângelo, do Laboratório de Biologia do Instituto Federal do Paraná, por me ajudarem e proporcionarem tantos ensinamentos,

A CAPES, pelo apoio financeiro durante o mestrado,

Aos membros da comissão avaliadora de qualificação, Professor Dr. André Marcos Santana e Professora Dr. Marilda Onghero Taffarel, por disponibilizarem o seu tempo para acorrer como meu aprendizado e crescimento profissional.

Ao Professor Dr. Jefferson Gandra e a Professora Dra. Adalgiza Pinto Neto, por contribuírem na execução do trabalho,

Ao meu orientador Professor Dr. Antonio Campanha Martinez por me orientar desde o primeiro ano de graduação até o mestrado, pelo tempo dedicado e por me ofertar tanto aprendizado em todo esse tempo, e

Meus mais sinceros agradecimentos a cada um que indiretamente também me ajudou em todo esse tempo de mestrado e na execução desse trabalho.

Só fazemos melhor aquilo que repetidamente insistimos em melhorar. A busca da excelência não deve ser um objetivo, e sim um hábito.
Aristóteles.

AValiação IN VITRO DO SÊMEN BOVINO SUPLEMENTADO COM QUERCETINA, ALBUMINA E PLURONIC® F-127

Resumo

A criopreservação faz com que reduza a viabilidade e fertilidade do espermatozoide. Com isso, estão surgindo novas técnicas e métodos de criopreservação, em que diferentes proteínas, antioxidantes e agentes crioprotetores estão sendo incorporados ao meio de congelação para aumentar criossobrevivência dos espermatozoides. O objetivo desta pesquisa foi avaliar aumento da ação da quercetina com a adição de albumina e Pluronic® F-127, por meio da melhora da viabilidade do espermatozoide. Para isso, foi feito a coleta de sêmen de 20 touros Zebuínos, pertencentes a uma Fazenda na cidade de Alto Paraíso-PR. Após a ejaculação, o sêmen foi analisado e foi selecionado 6 touros com ejaculados que tiveram dentro do padrão mínimo de 70% de motilidade progressiva, vigor 3 e no máximo 30% de alterações na morfologia espermática. Em seguida, foi congelado o sêmen, sendo adicionados em diferentes condições de tratamentos a quercetina, Pluronic® F-127 e albumina. Ao descongelar as amostras de sêmen, elas foram imediatamente analisadas pelo Sistema Computadorizado de Análise de Espermatozoides (CASA). Depois, foi realizado a análise estatística por meio do PROC MIXED do SAS (versão 9.4), utilizando também o teste de tukey ($p \leq 0,05$). Com isso, obteve-se o resultado de que quercetina e albumina ao meio de congelação (TRIS-gema) do sêmen bovino altera a motilidade total após descongelar. Entretanto, não houve diferença estatística com o tratamento controle, sendo necessário mais estudos com a suplementação de quercetina e albumina, porém com maior número de animais e mais número de doses, podendo então apresentar diferença estatística. Os outros parâmetros avaliados pelo CASA como motilidade progressiva (%), DCL, DAP, BCF, LIN, WOB, VSL e VAP não indicaram diferença estatísticas, entre os tratamentos ($p > 0,05$).

Palavras-chave: criopreservação, touros, zebuínos, antioxidante.

IN VITRO EVALUATION OF BOVINE SEMEN SUPPLEMENTED WITH QUERCETIN, ALBUMIN AND PLURONIC® F-127

Abstract

Cryopreservation reduces sperm viability and fertility. As a result, new cryopreservation techniques and methods are emerging, in which different proteins, antioxidants and cryoprotective agents are being incorporated into the freezing medium to increase sperm cryosurvival. The objective of this research was to evaluate the increase in the action of quercetin with the addition of albumin and Pluronic® F-127, through the improvement of sperm viability. For this, semen was collected, through the electroejaculator, from 20 Zebu bulls, belonging to a farm in the city of Alto Paraíso-PR. After ejaculation, the semen was analyzed and 6 bulls were selected with ejaculates that had within the minimum standard of 70% progressive motility, vigor 3 and a maximum of 30% changes in sperm morphology. Then, the semen was frozen, and quercetin, Pluronic® F-127 and albumin were added under different treatment conditions. Upon thawing the semen samples, they were immediately analyzed by the Computerized Sperm Analysis System (CASA). Then, statistical analysis was performed using PROC MIXED from SAS (version 9.4), also using the tukey test ($p \leq 0.05$). Thus, we obtained the result that quercetin and albumin in the freezing medium (TRIS-yolk) of bovine semen alters the total motility after thawing. However, there was no statistical difference with the control treatment, requiring further studies with quercetin and albumin supplementation, but with a larger number of animals and more number of doses, thus being able to present a statistical difference. The other parameters evaluated by CASA such as progressive motility (%), DCL, DAP, BCF, LIN, WOB, VSL and VAP did not indicate statistical difference between treatments ($p > 0.05$).

Keywords: cryopreservation, bulls, zebu cattle, antioxidant.

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
1.1 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	12
1.1.1. Perióxido de hidrogênio (H ₂)	13
1.1.2. Radical superóxido (O ₂ ⁻)	13
1.1.3. Radical hidroxilo (OH ⁻)	14
1.2 Quercetina.....	15
1.2.1. Ação da quercetina.....	15
1.2.2. Estudos sobre quercetina.....	16
1.3 Albumina	17
1.4 Pluronic® F-127	17
2. HIPÓTESES	19
3. OBJETIVOS.....	19
3.1 Objetivo Geral	19
3.2 Objetivos Específicos.....	19
4. JUSTIFICATIVA	19
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
5.1 Coleta de Sêmen	19
5.2 Congelação e descongelção de sêmen.....	20
5.3 Sistema Computadorizado de Análises Espermáticas (CASA).....	20
6. RESULTADOS.....	21
7. DISCUSSÃO.....	22
8. CONCLUSÃO	24
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O rápido crescimento da população mundial ocasiona significativo aumento do consumo de alimentos, gerando preocupação com a produção de proteínas de origem animal para o suprimento desta demanda (FAO, 2017). Neste âmbito, o Brasil possui relevância em se tratando da nutrição mundial, uma vez que é o quinto maior país em extensão territorial contendo, o maior rebanho bovino comercial do planeta, apresentando 221,81 milhões de cabeças (IBGE, 2018).

O número de abates de bovinos no Brasil foi de 39,2 milhões de cabeças em 2017, com produção por volta de 9,71 milhões de toneladas de carcaça, ocupando 14,4% da produção mundial de carne (ABIEC, 2018). Entretanto, a pecuária de corte brasileira ainda possui baixa eficiência produtiva e ocupa o segundo lugar no ranking mundial de produção de carne, sendo os Estados Unidos em primeiro lugar, que produzem 17,9% da carne mundial (ABIEC, 2018).

Levando-se em conta a significância desses animais como uma importante fonte de proteína animal, é imprescindível o desenvolvimento e aprimoramento das tecnologias que auxiliam o aumento da produtividade nas propriedades, aprimorando os sistemas de criação e a rentabilidade dos rebanhos. Como a inseminação artificial, que é a biotecnologia reprodutiva mais utilizada em todo o mundo e o uso dessa técnica traz grandes vantagens para os rebanhos, se comparada com a monta natural (LIMA et al., 2010; LAMB e MERCADANTE, 2016; BARUSELLI et al., 2018).

O mercado nacional de inseminação artificial comercializou por volta de 7,0 milhões de doses de sêmen em 2002. Já em 2018, foi vendido 15,4 milhões de doses de sêmen (ASBIA, 2019), com crescimento de 220% nesse período, demonstrando claramente que a inseminação artificial ganhou espaço no Brasil com o passar dos anos (BARUSELLI et al., 2019).

Neste sentido, a criopreservação é muito importante, pois colabora com a distribuição do sêmen à longas distâncias, contribuindo, assim, para o crescimento das tecnologias reprodutivas, como inseminação artificial e fertilização *in vitro* (KUMAR et al., 2019), viabilizando a obtenção de animais geneticamente superiores, e também a padronização dos rebanhos (BOZZI, et al., 2023). Ademais, o sêmen criopreservado possibilita um maior intervalo de tempo entre a colheita e a inseminação artificial

(CÂMARA e GUERRA, 2011).

No entanto, a congelação do sêmen não é um processo natural e não houve adaptação da pressão evolutiva a ponto de selecionar os espermatozoides que são mais resistentes ao processo de congelação (CONDESSA et al., 2018). O espermatozoide possui sensibilidade à criopreservação, uma vez que passa por várias formas de estresse, como: físico, químico, osmótico e oxidativo, o que compromete a qualidade do espermatozoide e da fertilidade (EZZATI et al., 2020; AMIDI et al., 2016).

Os espermatozoides são expostos a inúmeros fatores prejudiciais durante esse processo de criopreservação, como desequilíbrio iônico, acidose celular, ativação das proteases, transição de fase da membrana, privação de energia, desestabilização do citoesqueleto, e síntese de espécies reativas de nitrogênio (RNS) e de espécies reativas de oxigênio (EROs) (UPADHYAY et al., 2021).

Por isso, a utilização de diluentes são importantes, uma vez que a função dele é proteger do choque térmico na congelação e descongelação. Os meios diluentes são compostos por açúcares, crioprotetores, tampões e antibióticos, para que seja fornecida nutrição, proteção contra o frio, manutenção do pH e inibição bacteriana (GRAHAM, 1995).

1.1 Espécies Reativas de Oxigênios (EROs)

As espécies reativas de oxigênio (EROs), fazem parte de processos vitais dos espermatozoides sob concentrações fisiológicas, como maturação, capacitação, hiperativação espermática, reação acrossomal e fusão espermatozoide-oócito (SAALU, 2010).

Entretanto, a criopreservação faz com que ocorra a produção em excesso de EROs, podendo danificar o sistema intracelular de defesa antioxidante do espermatozoide, que é frágil, por causa da escassez de citoplasma. Com isso, torna-se mais suscetível ao estresse oxidativo, já que as EROs interagem com os lipídeos, com as proteínas da membrana, com o DNA mitocondrial e nuclear, fazendo com que haja uma redução da motilidade, da viabilidade dos espermatozoides e da taxa de fecundação (TONIOLLI et al., 2017).

As principais EROs notáveis resultantes do metabolismo espermático são o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical superóxido (O_2^-) e o radical hidroxil (OH) (VENDITTI et al, 2013; LENZI et al, 2000; MAIA et al, 2009).

1.1.1 Perióxido de hidrogênio

O H₂O₂ é produzido quando duas moléculas de O₂⁻ reagem com dois H⁺, esta reação pode acontecer espontaneamente ou catalisada por ação da enzima superóxido dismutase (SOD), habitualmente presente nas células dos mamíferos. (VENDITTI et al, 2013; TURRENS, 2003; LAMBERT et al, 2004) (Figura 1).



Figura 1. Formação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a partir da reação entre dois íons superóxido (O₂⁻) e dois prótons de hidrogênio (H⁺) (Fonte: SILVA, 2016).

O H₂O₂ oriundo por dismutação do O₂⁻, por apresentar estabilidade em sua estrutura, não é considerado exatamente um radical livre. No entanto, é precursor na formação de uma potente ERO, o OH. Ademais, o H₂O₂ apresenta meia-vida longa e capacidade de se difundir por meio das membranas biológicas (FORD, 2004; TURRENS, 2003; GRIVEAU et al, 1997; BARREIROS et al, 2006).

1.1.2 Radical superóxido (O₂⁻)

O O₂⁻ é um radical livre formado a partir da reação entre um elétron livre e uma molécula de O₂, que é gerado principalmente durante a cadeia respiratória mitocondrial e, também, é o precursor da maioria das EROs, como demonstrado na Figura 2 (VENDITTI et al, 2013, TURRENS, 2003).

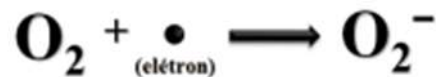


Figura 2. Reação entre uma molécula de oxigênio (O₂) e elétron livre promovendo a formação do radical superóxido (O₂⁻) (Fonte: SILVA, 2016).

A maior parte do O₂⁻ é produzido dentro da matriz mitocondrial, este radical livre não consegue atravessar as membranas lipídicas e tem vida curta sendo

imediatamente convertido, por ação enzimática, à H₂O₂ (MAIA et al., 2009; LENAZ, 2001; NOGUEIRA et al., 2013).

1.1.3 Radical hidroxil (OH[•])

O OH[•] é apresentado como um dos mais potentes agentes oxidantes, que é capaz de atravessar membranas e reagir com várias moléculas, como lipídeos insaturados das membranas e DNA. Ele é oriundo a partir do H₂O₂ e a estrutura é constituída por um átomo de hidrogênio ligado a um átomo de oxigênio, onde um dos elétrons do O₂ encontra-se desemparelhado (PRYOR et al., 1986; PASTOR et al., 2000; TURRENS, 2003).

O H₂O₂ é apontado como um dos mais potentes agentes oxidantes, que possui capacidade de atravessar membranas e reagir com moléculas, tais como lipídeos insaturados das membranas e DNA. Este é sintetizado a partir do H₂O₂ e sua estrutura é formada por um átomo de hidrogênio ligado a um átomo de oxigênio, onde um dos elétrons do O₂ encontra-se desemparelhado (TURRENS, 2003). Este radical é oriundo da reação de reação de Haber-Weiss (Figura 3) (FORD, 2004; GRIVEAU et al., 1997).

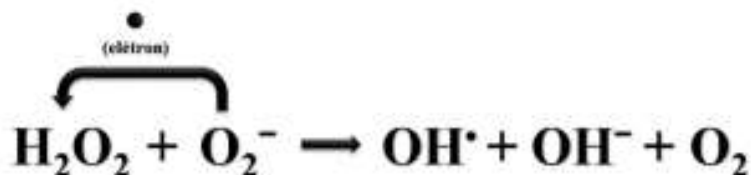


Figura 3. Uma molécula de H₂O₂ recepta um elétron proveniente do O₂⁻, denominada de Reação de Haber-Weiss (Fonte: SILVA, 2016).

As novas descobertas sobre os efeitos da criopreservação de espermatozoides, resultaram no desenvolvimento de técnicas e métodos de criopreservação, em que diferentes proteínas, antioxidantes e agentes crioprotetores estão sendo incorporados ao meio de congelação para aumentar a criossobrevivência dos espermatozoides (HEZAVEHEI et al., 2018).

1.2 Quercetina

A quercetina (3, 5, 7, 3'-4'-pentahidroxi-flavona) é comumente encontrada em vegetais, grãos, frutas, flores, chás (GARGOURI et al., 2011). Ela é conhecida por ser uma excelente agente com qualidades terapêuticas tais como, antineoplásica, antiarrítmica, antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória e antioxidante (KELLY, 2011). Além do mais, possui a capacidade de se ligar a substâncias tais como, transportadores de hormônios, enzimas, proteínas e DNA (ALRAWAIQ e ABDULLAH, 2014).

Ela é um flavonoide do grupo dos compostos polifenólicos, considerada como um antioxidante natural não enzimático (LIU et al., 2010). Os antioxidantes não enzimáticos são substâncias de baixo peso molecular que agem como removedores dos agentes causadores dos danos oxidativos ou como reparadores da lesão já estabelecida. Estes são de origem natural, normalmente oriunda de vegetais, ou de origem sintética (ANDRADE et al., 2010).

Dentre os flavonoides, a quercetina se sobressai por ter maior bioatividade que os outros, a exemplo da rutina. Ela é insolúvel em éter e outros solventes apolares. Por isso, sua dissolução quando, em pó, é realizada na presença de bases (GARGOURI et al., 2011).

As qualidades antioxidante e antirradicalar estão diretamente ligadas à estrutura molecular, que são alteradas de acordo com a adição e a posição de determinados grupos funcionais. Quanto maior a quantidade de hidroxilas livres, maior será a atividade antirradicalar ou redutora do flavonoide (SÁ, 2013).

1.2.1 Ação da quercetina

A quercetina apresenta três importantes elementos estruturais que estão ligados com sua ação antioxidante. Um deles é a existência do grupo catecol, causador da formação de radicais fenoxil, estáveis após a doação de hidrogênio; uma dupla ligação entre os carbonos, que estão em conjugação como o grupo 4-carbonil, permitindo a saída a elétron do radical fenoxil; um grupamento 3-OH combinado com uma dupla ligação entre carbonos, resultando na estabilização dos elétrons que foram reorganizados na molécula (SILVA e GUERRA, 2012).

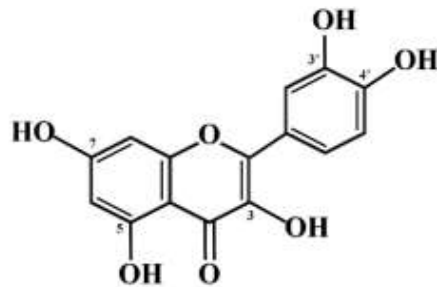


Figura 4. Estrutura molecular da quercetina (SILVA, 2016)

O mecanismo de ação da quercetina acontece em três etapas distintas: na interação com íons superóxido; na formação de radicais hidroxila, por quelar íons ferro; e na peroxidação lipídica, por reagir com radicais de peróxido de lipídios (AFANAS'EV et al., 1989).

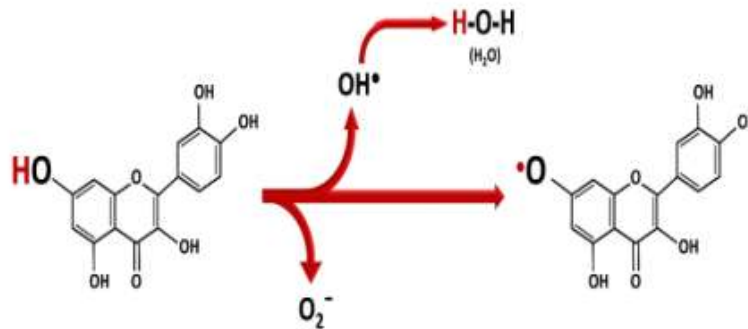


Figura 5. Representação esquemática da ação da quercetina estabilizando os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) ou radical hidroxil (OH^{\cdot}) (Fonte: SILVA, 2016).

1.2.2 Estudos sobre os efeitos da quercetina

A quercetina tem atraído bastante atenção de pesquisadores por suas propriedades antioxidantes, biológicas e farmacológicas (MALEKIA et al., 2019; MUTHA et al., 2021).

A quercetina apresenta efeitos benéficos nos parâmetros espermáticos (motilidade progressiva, viabilidade, anormalidade, integridade da membrana, dano à cromatina, apoptose e ultra-estrutura) e, também, possui capacidade antioxidante total e a peroxidação lipídica no plasma seminal pós-descongelamento (SOBEH et al., 2017).

Uma pesquisa feita por Silva (2016) apontou que a inclusão da quercetina ao

diluyente, possibilita às células espermáticas maior resistência aos danos oxidativos, quando submetidas a uma situação de elevado estresse, visto que contribui para diminuir a concentração das EROs e ocorrência de peroxidação lipídica.

Outro estudo executado por Tironi et al (2019), concluiu que a adição da quercetina no diluyente seminal, levou ao aumento na velocidade do espermatozoide e, quando comparado ao grupo controle, os espermatozoides mantiveram taxa metabólica mais alta, após o processo de descongelação.

1.3 Albumina

Devido à sua natureza fenólica, os flavonoides são bastante polar, mas pouco solúvel em água e sua absorção pode ser escassa (VAN ACKER et al., 1996; NAMAKA, 2008). No entanto, uma série de investigações bioquímicas e biológicas moleculares revelaram que as proteínas, como a albumina, são frequentemente “alvos” para flavonoides terapeuticamente ativos de origem natural e sintética, ou seja, tem a facilidade de se ligarem melhorando a absorção, sendo a quercetina um exemplar (LAMSON et al., 2000).

1.4 Pluronic® F-127

Pluronic é um dos nomes comerciais dos Poloxamers, copolímeros tribloco com estrutura “ABA” onde dois blocos de poli-óxido de etileno estão divididos por um bloco de poli-óxido de propileno (BATRAKOVA et al., 2009).

Copolímeros em bloco com caráter anfifílico formam micelas, que tem a habilidade de se combinar com o fármaco e otimizar a solubilidade, a estabilidade, a permeabilidade, controlar a liberação e proteger o fármaco (KABANOV et al., 2002; ALIABADI e LAVASANIFAR, 2006; MUELLEN et al., 2009).

A letra que aparece antes da numeração apresenta o estado físico em que o Pluronic é comercializado, em forma líquida (L), forma de pasta (P) e em forma de flocos (F). Enquanto os números são indicativos da composição estrutural do Pluronic, sendo que os dois primeiros dígitos mostram informação sobre a massa molecular da porção hidrofóbica (PPO) do Pluronic, e a fração hidrofílica (PEO) que compõe a estrutura pode ser encontrada pela multiplicação do último dígito por 10 (KABANOV et al., 2002).

Tal automontagem em solução aquosa permite ao Pluronic uma estrutura formada por uma coroa hidrofílica (grupos PEO) e um o núcleo composto pelos grupos hidrofóbicos (PPO). A proposta de mecanismos de redução das nanopartículas por meio do Pluronic é dado exatamente nesta estrutura, já que de acordo com a literatura a formação de nanopartículas por meio do Pluronic pode seguir três etapas com papéis diferentes para cada fração da cadeia. Na primeira etapa, os íons de metal são reduzidos por contribuição dos grupos hidrofílicos. Depois disso, os núcleos sintetizados sofrem a adsorção do polímero em sua superfície por ação dos grupos hidrofóbicos. Em uma terceira e última etapa, as nanopartículas são favorecidas, estabilizadas e tem seu crescimento determinado pela dimensão de cadeia do grupo hidrofóbico (ALEXANDRIDIS e TSIANOU, 2011).

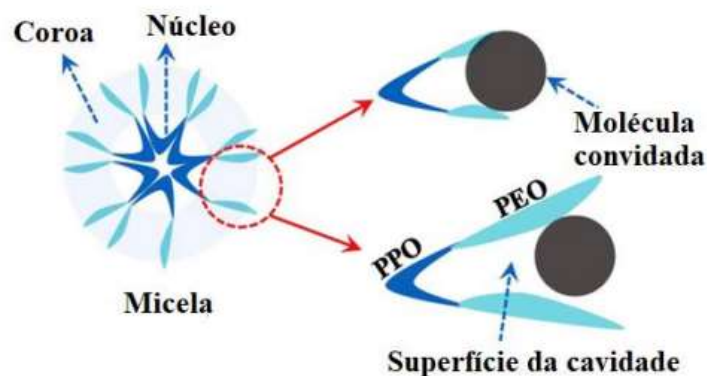


Figura 6. Estrutura da micela do Pluronic durante o processo de formação das nanopartículas (fonte: KHULLAR et al., 2010).

Como a quercetina é considerada lipofílica (NEMETH e PISKULA, 2007), a característica interessante do Pluronic, neste caso, é a automontagem em estruturas similares a micelas, quando é atingida uma concentração limite, conhecida como concentração micelar crítica (CMC), que é diferente para cada Pluronic que depende do balanço lipofílico e hidrofílico da cadeia. No caso do Pluronic® F-127, a nomenclatura indica que ele se apresenta na forma de floco e 70% da sua estrutura é composta pelo monômero hidrofílico e o restante hidrofóbico (ALEXANDRIDIS e TSIANOU., 2011).

Levando-se em conta a função da quercetina, o objetivo do trabalho foi avaliar se a adição da albumina e do Pluronic® F-127 nas soluções de diferentes tratamentos, leva ao aumento da ação da quercetina na viabilidade dos espermatozoides criopreservados.

2. HIPÓTESES

A quercetina traz benefícios para a viabilidade dos espermatozoides. Assim a adição de albumina e Pluronic® F-127 aumenta a biodisponibilidade da quercetina, quando utilizados como veículos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar aumento da ação da quercetina com a adição de albumina e Pluronic® F-127, por meio da melhora da viabilidade do espermatozoide.

3.2 Objetivos Específicos

- Suplementar o sêmen com as soluções de quercetina, albumina e Pluronic® F-127 juntamente com o diluente convencional para congelar o sêmen de bovino.
- Avaliação da viabilidade e alterações espermáticas nas diferentes condições de tratamentos.

4. JUSTIFICATIVA

Este estudo teve por finalidade avaliar o efeito da quercetina com adição de albumina e Pluronic® F-127, uma vez que a quercetina é utilizada devido a ação antioxidante que possui. Com isso, com a suplementação da albumina e Pluronic® F-127 otimizará a ação da quercetina.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Coleta de sêmen

Foram coletados sêmen de vinte touros, pertencentes a uma Fazenda na cidade

de Alto Paraíso, Paraná, Brasil. Após a ejaculação, o sêmen foi analisado no microscópio, os ejaculados que obtiveram padrão de no mínimo 70% de motilidade progressiva, vigor 3 e no máximo 30% de alterações na morfologia espermática, estes foram selecionados.

Os bovinos que obtiveram o padrão mínimo para a seleção, foram seis touros Zebuínos. Estes animais estavam em atividade sexual, à pasto e com faixa etária média de seis anos. A coleta de sêmen foi feita por meio do eletroejaculador, foi coletado uma dose por touro e seguiu a recomendação do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal CBRA (2013).

5.2 Congelação e descongelação do sêmen

O ejaculado de cada animal foi dividido em cinco tratamentos, sendo o Tratamento 0, o controle; Tratamento 1, a quercetina; Tratamento 2, a quercetina e albumina; Tratamento 3, a quercetina e Pluronic® F-127; Tratamento 4, a quercetina, albumina e Pluronic® F-127. Sendo assim, totalizando 180 palhetas.

O ejaculado de cada touro foi diluído em TRIS-gema (HAFEZ, 1995), e divididos em cinco tratamentos, sendo envasados seis palhetas por tratamento, com concentração ajustada para 10 milhões de espermatozoides (CBRA, 2013)

As palhetas foram refrigeradas em temperatura de 5°C durante 4 horas, e então colocadas no vapor de nitrogênio, durante cinco minutos, sob curva de resfriamento de 0,47°C/min, quando foram mergulhadas em nitrogênio líquido -196°C, e acondicionadas no botijão de sêmen.

Para a descongelação do sêmen, colocou-se as palhetas em banho-maria a 38°C por 50 segundos (BITTENCOURT, 2009). Onde o conteúdo da palheta foi colocado no eppendorf na temperatura de 36°C por 30 segundos. Depois disso, foi feita a análise espermática, com auxílio de um equipamento de Sistema Computadorizado de Análise de Espermatozoides (HAMILTON TORNE IVOS II), para verificação da cinética espermática.

5.3 Sistema Computadorizado de Análise de Espermatozoides (CASA)

A análise computadorizada foi realizada no Laboratório de Reprodução Animal- LABRA, da Universidade Federal da Fronteira Sul– UFFS, Campus Realeza,

com a utilização do sistema automatizado Computer Assisted Semen Analysis (CASA) para avaliações seminais pós-descongelamento (HAMILTON THORNE IVOS II), que visualiza, digitaliza e analisa imagens de espermatozoides sucessivas, fornecendo assim informações precisas e significativas sobre a cinética celular individual, bem como valores resumidos da população global.

Para a análise, amostra de sêmen descongelada foi imediatamente analisada, após diluição em 100µL de citrato de sódio e 250µL do conteúdo da palheta. Depois disso foi pipetado 3 µL dessa diluição e colocado em cada uma lâmina específica para avaliação no CASA (LEJA®).

Uma câmara de leitura de cada lâmina foi usada, e três campos distintos de cada amostra foram automaticamente registrados e avaliados através do microscópio e sistema do CASA.

Os seguintes parâmetros foram avaliados: motilidade total (%), motilidade progressiva (%), velocidade curvilínea, (VCL; µm/ s), velocidade em linha reta (VSL; µm·s⁻¹), velocidade média do caminho (VAP; µm·s⁻¹), distância curvilínea (DCL; µm), distância reta (DSL; µm), distância média percorrida (DAP;µm), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH; µm), frequência de batimento cruzado(BCF; Hz), oscilação (WOB; [VAP / VCL] × 100) e linearidade (LIN; [VSL / VCL] × 100).

Os dados foram analisados utilizando o PROC MIXED do SAS (versão 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC), utilizando também o Teste de Tukey, com significância de p≤0,05.

6. RESULTADOS

A tabela 1 apresenta os valores médias, seguidos pelo erro padrão, dos parâmetros espermáticos avaliados nos diferentes tratamentos.

Tabela 1. Parâmetros da cinética espermática (média ± erro padrão) no sêmen de touros submetidos a diferentes tratamentos.

Parâmetros	Tratamentos				
	0	1	2	3	4
Motilidade total (%)	11,05± 1,6 ^d	8,13± 1,65 ^{acd}	12,91± 1,53 ^{bd}	11,17± 1,60 ^d	7,90± 1,58 ^{acd}
Motilidade progressiva(%)	4,55± 0,82	4,41± 0,84	5,78± 0,76	5,47± 0,81	3,75± 0,76

DCL (mm)	45,06 ± 3,81	45,66 ± 3,93	43,64 ± 3,93	47,01 ± 3,81	40,49 ± 3,75
DSL (mm)	17,02 ± 1,91	18,51 ± 1,97	17,73 ± 1,83	18,72 ± 1,91	16,61 ± 1,88
DAP (mm)	24,33 ± 2,05	24,86 ± 2,12	24,25 ± 1,96	25,67 ± 2,05	22,72 ± 2,02
VCL (mm·s ⁻¹)	114,60 ± 6,59	129,63 ± 6,80	130,09 ± 6,31	134,75 ± 6,59	119,63 ± 6,49
VSL (mm·s ⁻¹)	53,98 ± 3,15	55,35 ± 3,25	57,80 ± 3,02	58,83 ± 3,15	54,59 ± 3,10
VAP (mm·s ⁻¹)	74,51 ± 3,60	75,74 ± 3,72	79,23 ± 3,45	78,54 ± 3,60	75,65 ± 3,55
BCF (Hz)	33,29 ± 2,10	34,92 ± 2,16	30,35 ± 2,01	31,84 ± 2,10	34,63 ± 2,07
ALH (mm)	10,47 ± 0,43	10,28 ± 0,45	10,04 ± 0,42	9,80 ± 0,43	10,48 ± 0,43
LIN	64,58 ± 3,90	70,24 ± 4,02	75,03 ± 3,73	76,23 ± 3,90	69,93 ± 3,84
(VSL/VCL)					
WOB	58,99 ± 1,58	57,49 ± 1,63	61,40 ± 1,51	58,05 ± 1,58	60,05 ± 1,56
(VAP/VCL)					

Valores seguidos por letras diferentes, diferem-se ($p \leq 0,05$).

Observou-se que a motilidade total (%), apresentou diferença entre o tratamento 2, tratamento 1 e tratamento 4, sendo o tratamento 2 (quercetina e albumina) o que apresentou melhor resultado ($p \leq 0,05$). No entanto, em relação ao parâmetro da motilidade total (%), não teve diferença estatística entre o tratamento 0 (controle) e tratamento 2. Em relação aos outros parâmetros, motilidade progressiva (%), DCL, DAP, BCF, LIN, WOB, VSL e VAP não indicaram diferença estatísticas, entre os tratamentos ($p > 0,05$).

7. DISCUSSÃO

A motilidade espermática é um dos principais parâmetros utilizados antes e após a congelação do sêmen, para avaliar tanto a qualidade, quanto a capacidade de fertilização do espermatozoide (SIMONIK et al., 2015). Com isso, pode-se visualizar a importância que teve a suplementação de quercetina e albumina, uma vez que esse parâmetro apresentou diferença estatística.

Os outros parâmetros avaliados pelo Sistema Computadorizado de Análise de Espermatozoides (CASA) - como a velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL), velocidade média do caminho (VAP), distância curvilínea (DCL), distância reta (DSL), distância média percorrida (DAP), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento cruzado (BCF), oscilação (WOB) e linearidade (LIN), motilidade progressiva (%) - não apresentaram valores de diferença significativa, demonstrando assim que os tratamentos testes foram tão eficazes quanto ao diluente convencional (TRIS-gema).

Reis et al. (2023), relataram que, embora os achados sejam significativamente os mesmos, o fato do padrão seminal dos animais utilizados serem bons, mascara os resultados, que provavelmente teriam uma ação melhor, se o sêmen analisado fosse de baixo desempenho na criopreservação, oferecendo um desafio maior para o antioxidante testado. Isto justifica o fato da maioria dos parâmetros não terem diferença estatística entre si, uma vez que a qualidade seminal avaliada foi de ótima qualidade.

Segundo o estudo realizado por Tironi et al. (2019), relataram que ao adicionar quercetina ao diluente seminal antes da congelação, observou-se uma melhor qualidade dos espermatozoides que se manifesta com o gameta masculino mais rápidos, podendo aumentar as taxas de fertilização. Sendo que a capacidade de fertilização do espermatozoide pode ser avaliada por vários parâmetros, principalmente o VCL. Na referente pesquisa, todas as velocidades avaliadas pelo programa CASA aumentaram na condição em que tinha a quercetina, incluindo VCL, demonstrando a importância na suplementação em diluente seminal bovino. Entretanto, na presente pesquisa, os parâmetros como VCL, VAP e VSL não tiveram diferença estatística.

Os dois grupos de pesquisadores, Tironi et al. (2019) e Reis et al. (2023), afirmaram que a suplementação de quercetina no diluente seminal melhora a LIN, no entanto o Tratamento 1 (quercetina) não apresentou ter qualidade superior em comparação com os demais tratamentos testados.

A albumina é encontrada no plasma seminal, sendo importante por ter ação de antioxidante não enzimático (AGARWAL et al., 2008) e, também, tem facilidade de se ligarem com flavonóides, como a quercetina (LAMSON et al., 2000). Correlacionando com o resultado obtido pelo presente estudo, já que em relação à motilidade total, o tratamento 2, que continha quercetina e albumina, teve um melhor resultado.

Shirky et al., (2020) utilizou Pluronic® F-127 pra formar micelas e assim liberar o fármaco hidrofóbico lentamente, visando reduzir os efeitos colaterais. Até o momento, não há relato deste copolímero utilizado para a criopreservação do sêmen bovino, mas devido a característica hidrofóbica da quercetina, foi avaliado se o Pluronic® F-127 melhoraria a distribuição deste antioxidante, entretanto não houve

diferença estatística Tratamento 3 e 4, que continha este copolímero.

8. CONCLUSÃO

A adição de quercetina e albumina ao meio de congelação (TRIS-gema) do sêmen bovino altera a motilidade total após descongelar. Entretanto, não houve diferença estatística com o tratamento controle, sendo necessário mais estudos com a suplementação de quercetina e albumina.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFANAS'EV, I.B.; DOROZHKO, A.I.; BRODSKII, A.V. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, v.38, p.1763-1769, 1989.
- AGARWAL A, MAKKER K, SHARMA R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. **American Journal of Reproductive Immunology**. v.59, p.2-11, 2008.
- ALEXANDRIDIS, P.; TSIANOU, M. "Block Copolymer-Directed Metal Nanoparticle Morphogenesis and Organization". **Eur. Polym. J.** v. 47 n. 4, pp.569–583, 2011.
- ALIABADI e LAVASASNIFAR, Polymeric micelles for drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v.3, n.1, p. 139-162, 2006.
- ALRAWAIQ, N.S.; ABDULLAH, A. A review of flavonoid quercetin: metabolism, bioactivity and antioxidant properties. **International Journal of Pharm Tech Research**, v.6, p.933-941, 2014.
- AMIDI, F.; PAZHOHAN, A.; SHABANI NASHTAEI, M.; KHODARAHMIAN, M.; NEKOONAM, S. The role of antioxidants in sperm freezing: A review. **Cell Tissue Bank**, v.17, p. 745–756, 2016.
- ANDRADE, E.R.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.34, p.79-85, 2010.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES (ABIEC)**. Sumário 2018. Disponível em: <<http://abiec.siteoficial.ws/images/upload/sumario-pt-010217.pdf>>. Acesso em: 08/04/2023.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (ASBIA)**. Index ASBIA Mercado, 2019. Disponível em: <<https://www.lancerural.com.br/vendas-de-semen-bovino-crescem-no-1o-semester-de-2018/presidente-da-asbiasergio-saud-anuncia-aumento-nas-vendas-de-semen/>>. Acesso em: 20/03/2023.

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

BARUSELLI, P.S. **Avaliação do mercado de IATF no Brasil**. Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal/FMVZ/USP, 1. ed., 2019a. Disponível em: <<http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/>>. Acesso em: 21/03/2023.

BARUSELLI, P.S.; FERREIRA, R.M.; SÁ FILHO, M.F.; BÓ, G.A. Review: Using artificial insemination v. natural service in beef herds. **Animal**, v.12, p.45-52, 2018.

BATRAKOVA, E.V.; KABANOV, A.V.. "Pluronic Block Copolymers: Evolution of Drug Delivery Concept from Inert Nanocarriers to Biological Response Modifiers". **J Control Release**. v. 130 n. 2, pp.98–106, 2009.

BITTENCOURT, R. F. **Viabilidade e fertilidade do sêmen ovino criopreservado com glicerol ou dimetilacetamida em meio com trealose e EDTA**. (tese). (Botucatu): Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 200 p. 2009.

BOZZI, A. R.; PARTICELLI, L. H.; VIANA, C. H. C.; QUIRINO, C. R.; DE ANDRADE, A. F. C.; DE FREITAS, F. V.; PASSARELLI, M. S.; CELEGHINI, E. C. C.; BEDOYA, H. J. N.; CHAY-CANUL, A. J.; DA COSTA, R. L. D. Adição de sucos de laranja, abacaxi e beterraba em diluidor para criopreservação de sêmen de carneiros. **Ciência Animal Brasileira**, v. 24, 2023.

CÂMARA, D. R.; GUERRA, M. M. P. Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.1, p.33-40, jan/mar. 2011.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. Belo Horizonte, MG. 3ª ed. 45p, 2013.

CONDESSA, M.A.K.V; PIMENTEL, A.L.; SEIXAS, F.A.V.; MARTINEZ, A.C. Purification, structural and biophysical characterisation of the major seminal plasma protein from Texel rams. **Anim Reprod Sci**. v. 189, p.11-18, 2018.

EZZATI, M.; SHANEHBANDI, D.; HAMDI, K.; RAHBAR, S.; PASHAIASL, M. Influence of cryopreservation on structure and function of mammalian spermatozoa: An overview. **Cell Tissue Bank**, v.21, p. 1–15, 2020.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Cenário da demanda por alimentos no Brasil, 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/brasil/noticias/detailevents/en/c/901168/>>. Acesso em: 16/02/2023.

FORD, W.C.L. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. **Human Reproduction Update**. v.10, p.387-399, 2004.

GARGOURI, B.; MANSOUR, R.B.; ABDALLAH, F.B.; ELFEKIH, A.; LASSOUED, S.; KHALED, H. Protective effect of quercetina against oxidative stress caused by dimethoate in human peripheral blood lymphocytes. **Lipids Health Diseases**, v. 10, p. 149, 2011.

GRAHAM, J. K. Response of spermatozoa to freezing. In: techniques for handling and utilization of transported cooled and frozen equine spermatozoa. **Proceedings**. Equine Sciences. Colorado State University Fort Collins, Colorado. USA. p.83-95, 1995.

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

HAFEZ, E.S.S. **Reprodução animal**. 6ª ed. São Paulo, Brasil: Editora Manole, 1995.

HEZAVEHEI, M.; SHARAFI, M.; KOUCHESFAHANI, H.M.; HENKEL, R.; AGARWAL, A.; ESMAEILI, V.; SHAHVERDI, A. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. **Reprod. Biomed**. v.37, p.327–339, 2018.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Sistema de Recuperação Automática (SIDRA) Efetivo do Rebanho Brasileiro**, 2018. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>>. Acesso em: 12/03/2023.

KABANOV, A. V; LEMIEUX, P.; VINOGRADOV, S.; ALAKHOV, V. "Pluronic ® Block Copolymers : Novel Functional Molecules for Gene Therapy". **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 54, p.223–233, 2002.

KHULLAR, P.; MAHAL, A.; SINGH, V.; BANIPAL, T. S.; KAUR, G.; BAKSHI, M. S. "How PEO-PPO-PEO Triblock Polymer Micelles Control the Synthesis of Gold Nanoparticles: Temperature and Hydrophobic Effects". **Langmuir**. v. 26 n. 13, pp.11363–11371, 2010.

KUMAR, A.; PRASAD, J.K.; SRIVASTAVA, N.; GHOSH, S.K. Strategies to minimize various stress-related freeze–thaw damages during conventional cryopreservation of mammalian spermatozoa. **Biopreserv. Biobank**, v.17, p.603–612, 2019.

LAMB, G.C.; MERCADANTE, V.R.G. Synchronization and artificial insemination strategies in beef cattle. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v.32, p.335-334, 2016.

Lambert AJ, Brand MD. Superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane. **Biochemical Journal**. v.382, p.511-517, 2004.

LAMSON, D.W.; BRIGNALL, M.S. **Altern. Med. Rev.** v.5, p.196–208, 2000.

Lenaz G. The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and Simplications in human pathology. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life**. v.52, p.159-164, 2001.

LENZI, A.; GANDINI, L.; PICARDO, M.; TRAMER, F.; SANDRI, G.; PANFILI, E. Lipoperoxidation damage of spermatozoa polyunsaturated fatty acids (PUFA): scavenger mechanisms and possible scavenger therapies. **Frontiers in Bioscience**. v.5, p.1-15, 2000.

LIMA, F.S.; VRIES, A.D.E.; RISCO, C.A.; SANTOS, J.E.P.; THATCHER, W.W. Economic comparison of natural service and timed artificial insemination breeding programs in dairy cattle. **J Dairy Sci**, v.93, p.4404-4413, 2010.

- LIU, S.; HOU, W.; YAO, P. et al. Quercetin protects against ethanol-induced oxidative damage in rat primary hepatocytes. **Toxicol. In vitro**. v.24, p.516-522, 2010.
- MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.33, p.183-193. 2009
- MALEKIA, S. J.; CRESPO, J. F.; CABANILLAS, B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. **Food Chemistry**, v. 299, p. 1-11, 2019.
- MUELLEN et al. **Targeted block copolymer micelles**. European Patent Office, EP 2025348 A1 20090218, 2009.
- MUTHA, R. E.; TATIYA, A. U.; SURANA, S. J. Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: an overview. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 1, p. 7-25, 2021.
- NAMAKA, M.; CROOK, A.; DOUPE, A.; KLER, K.; VASCONCELOS, M.; KLOWAK, M.; GONG, Y.; WOJEWNIK-SMITH, A.; MELANSON, M. **Neurol Res**, v.30, p. 710–719, 2008.
- NEMETH, K., & PISKULA, M. K. Food Content, Processing, Absorption and Metabolism of Onion Flavonoids. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.47, n.4, p.397–409, 2007.
- NOGUEIRA, B.G.; BITENCOURT, J.L.; SAMPAIO, B.F.B.; BENDER, E.S.C.; COSTA E SILVA, E.V.; ZÚCCARI, C.E.S.N. Peroxidação lipídica e agentes antioxidantes no sêmen de mamíferos. **Revista Eletrônica Veterinária**. v.15, p.1-15, 2013.
- PASTOR, N.; WEINSTEIN, H.; JAMISON, E.; BRENOWITZ, M. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBPDNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence specific binding. **Journal of Molecular Biology**, v.304, p.55- 68, 2000.
- PRYOR, W.A. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. **Annual Review of Physiology**, v.48, p.657-667, 1986.
- REIS, W.V.A.; PEREIRA, R.R.; VIEIRA JUNIOR, M.; CUNHA, C.C.T.; ACÁCIO, B.R.; MACEDO, G.G.; COSTA-E-SILVA, E.V.; SAMPAIO, B.F.B. Impact of quercetin, carnosine, and ozone in the cryopreservation on Nellore (*Bos indicus*) semen. **Anim Reprod.**; v.20, p.1-10, 2023.
- SÁ, L.Z.C. M. **Determinação eletroanalítica e espectrofotométrica da atividade antioxidante de fermentados de jabuticaba e vinhos de diferentes procedências**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.
- SAALU, L. O papel incriminador das espécies reativas de oxigênio na infertilidade masculina idiopática: uma evidência baseada avaliação. **Jornal Paquistão de Ciências Biológicas**, v.13, p.413, 2010.
- SILVA, E.C.B.; GUERRA, M.M.P. Terapias antioxidantes na criopreservação espermática. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.107, p.143-149, 2012.

SILVA, Luis Fernando Mercês Chaves. **Estudo sobre a redução do estresse oxidativo em sêmen Equino a partir da adição de quercetina nos diluentes de refrigeração e congelamento.** Orientador: Frederico Ozanam Papa. 2016. 94 f. Tese (Mestrado em Biotecnologia Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Botucatu. 2016.

SIMONIK, O., SICHTAR, J., KREJCARKOVA, A., RAJMON, R., STADNIK, L., BE DOLEZALOVA, M., BONIOVA, Z. Computer assisted sperm analysis – the relationship to bull field fertility, possible errors and their impact on outputs: a review. **Indian Journal of Animal Science.** v.85, p.3-11, 2015.

SOBEH, M.; HASSAN, S.A.; EL RAEY, M.A.; KHALIL, W.A.; HASSAN, M.A.E.; WINK, M. Polifenóis de Albizia harveyi exibem atividades antioxidantes e neutralizam os danos oxidativos e as alterações ultra-estruturais do sêmen de touro criopreservado. **Moléculas,** v.22, n.11, p.1-14, 2017.

TIRONI, S.M.T.; MARTINEZ, A. C.; SEIXAS, F.A.V.; STEFANELLO, T. F.; NAKAMURA, C.V.; MORAES, G.V. Effects of Treatment with Quercetin on the Quality of Cryopreserved Bovine Semen. **Acta Scientiae Veterinariae.** v.47, p.1635, 2019.

TONIOLLI, Ricardo; COSTA, Jonathan Maia da Silva. Reactive oxygen species, antioxidants and their implications for the quality of cryopreserved semen in domestic mammals. **Investigação.** Fortaleza. v.16, n.8, p.22-29, 2017.

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

UPADHYAY, V. R., RAMESH, V., DEWRY, R. K., KUMAR, G., RAVAL, K., PATPLIYA, P. Implications of cryopreservation on structural and functional attributes of bovine spermatozoa: An overview. **Andrologia,** v.53, n.8, 2021.

VAN ACKER, S. A. B. E.; VAN DEN BERG, D. J.; TROMP, M. N. J. L.; GRIFFIOEN, D. H.; VAN BENNEKOM, W. P.; VAN DER VIJGH, W. J. F.; BAST, A. **Free Radic Biol Med,** v. 20, p. 331–342, 1996.

VENDITTI, P.; DI STEFANO, L.; DI MEO, S. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. **Mitochondrion.** v.13, p.71-82, 2013.

ARTIGO REVISTA - CONTRIBUCIONES A LAS CIENCIAS SOCIALES

AValiação IN VITRO DO SÊMEN BOVINO SUPLEMENTADO COM QUERCETINA, ALBUMINA E PLURONIC® F-127

RESUMO

A criopreservação faz com que reduza a viabilidade e fertilidade do espermatozoide. Com isso, estão surgindo novas técnicas e métodos para aumentar a criossobrevivência dos espermatozoides. O objetivo desta pesquisa foi avaliar aumento da ação da quercetina com a adição de albumina e Pluronic® F-127, por meio da melhora da viabilidade do espermatozoide. Para isso, foi feito a coleta de sêmen de 20 touros Zebuínos, pertencentes a uma Fazenda na cidade de Alto Paraíso-PR. Após a ejaculação, o sêmen foi analisado e foi selecionado 6 touros com ejaculados que tiveram dentro do padrão mínimo de qualidade. Em seguida, foi congelado o sêmen, sendo adicionados em diferentes condições de tratamentos a quercetina, Pluronic® F-127 e albumina. As amostras de sêmen descongeladas, foram imediatamente analisadas pelo Sistema Computadorizado de Análise de Espermatozoides (CASA). Depois, foi realizado a análise estatística, por meio do PROC MIXED do SAS (versão 9.4), utilizando também o teste de tukey ($p \leq 0,05$). Com isso, obteve-se o resultado de que quercetina e albumina ao meio de congelação (TRIS-gema) do sêmen bovino altera a motilidade total após descongelar. Entretanto, não houve diferença estatística com o tratamento controle, sendo necessário mais estudos com a suplementação de quercetina e albumina. Os outros parâmetros avaliados pelo CASA como motilidade progressiva (%), DCL, DAP, BCF, LIN, WOB, VSL e VAP não indicaram diferença estatísticas, entre os tratamentos ($p > 0,05$).

Palavras-chave: criopreservação, touros, zebuínos, antioxidante.

1 INTRODUÇÃO

O rápido crescimento da população mundial ocasiona significativo aumento do consumo de alimentos, gerando preocupação com a produção de proteínas de origem animal para o suprimento desta demanda (FAO, 2017). Neste âmbito, o Brasil possui relevância em se tratando da nutrição mundial, uma vez que é o quinto maior país em extensão territorial contendo, o maior rebanho bovino comercial do planeta, apresentando 221,81 milhões de cabeças (IBGE, 2018).

O número de abates de bovinos no Brasil foi de 39,2 milhões de cabeças em 2017, com produção por volta de 9,71 milhões de toneladas de carcaça, ocupando 14,4% da produção mundial de carne (ABIEC, 2018). Entretanto, a pecuária de corte brasileira ainda possui baixa eficiência produtiva e ocupa o segundo lugar no ranking mundial de produção de carne, sendo os Estados Unidos em primeiro lugar, que produzem 17,9% da carne mundial (ABIEC, 2018).

Levando-se em conta a significância desses animais como uma importante fonte de proteína animal, é imprescindível o desenvolvimento e aprimoramento das tecnologias que auxiliam o aumento da produtividade nas propriedades, aprimorando os sistemas de criação e a rentabilidade dos rebanhos. Como a inseminação artificial, que é a biotecnologia reprodutiva mais utilizada em todo o mundo e o uso dessa técnica traz grandes vantagens para os rebanhos, se comparada com a monta natural (LIMA et al., 2010; LAMB e MERCADANTE, 2016; BARUSELLI et al., 2018).

O mercado nacional de inseminação artificial comercializou por volta de 7,0 milhões de doses de sêmen em 2002. Já em 2018, foi vendido 15,4 milhões de doses de sêmen (ASBIA, 2019), com crescimento de 220% nesse período, demonstrando claramente que a inseminação artificial ganhou espaço no Brasil com o passar dos anos (BARUSELLI et al., 2019).

Neste sentido, a criopreservação é muito importante, pois colabora com a distribuição do sêmen à longas distâncias, contribuindo, assim, para o crescimento das tecnologias reprodutivas, como inseminação artificial e fertilização in vitro (KUMAR et al., 2019), viabilizando a obtenção de animais geneticamente superiores, e também a padronização dos rebanhos (BOZZI, et al., 2023). Ademais, o sêmen criopreservado possibilita um maior intervalo de tempo entre a colheita e a inseminação artificial (CÂMARA e GUERRA, 2011).

No entanto, a congelação do sêmen não é um processo natural e não houve adaptação da pressão evolutiva a ponto de selecionar os espermatozoides que são mais resistentes ao processo de congelação (CONDESSA et al., 2018). O espermatozoide possui sensibilidade à criopreservação, uma vez que passa por várias formas de estresse, como: físico, químico, osmótico e oxidativo, o que compromete a qualidade do espermatozoide e da fertilidade (EZZATI et al., 2020; AMIDI et al., 2016).

Os espermatozoides são expostos a inúmeros fatores prejudiciais durante esse processo de criopreservação, como desequilíbrio iônico, acidose celular, ativação das proteases, transição de fase da membrana, privação de energia, desestabilização do citoesqueleto, e síntese de espécies reativas de nitrogênio (RNS) e de espécies reativas de oxigênio (EROs) (UPADHYAY et al., 2021).

Por isso, a utilização de diluentes são importantes, uma vez que a função dele é proteger do choque térmico na congelação e descongelação. Os meios diluentes são compostos por açúcares, crioprotetores, tampões e antibióticos, para que seja fornecida nutrição, proteção contra o frio, manutenção do pH e inibição bacteriana (GRAHAM, 1995).

1.1 Espécies Reativas de Oxigênios (EROs)

As espécies reativas de oxigênio (EROs), fazem parte de processos vitais dos espermatozoides sob concentrações fisiológicas, como maturação, capacitação, hiperativação espermática, reação acrossomal e fusão espermatozoide-oócito (SAALU, 2010).

Entretanto, a criopreservação faz com que ocorra a produção em excesso de EROs, podendo danificar o sistema intracelular de defesa antioxidante do espermatozoide, que é frágil, por causa da escassez de citoplasma. Com isso, torna-se mais suscetível ao estresse oxidativo, já que as EROs interagem com os lipídeos, com as proteínas da membrana, com o DNA mitocondrial e nuclear, fazendo com que haja uma redução da motilidade, da viabilidade dos espermatozoides e da taxa de fecundação (TONIOLLI et al., 2017).

As principais EROs notáveis resultantes do metabolismo espermático são o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical superóxido (O_2^-) e o radical hidroxil (OH) (VENDITTI et al, 2013; LENZI et al, 2000; MAIA et al, 2009).

1.1.1 Peróxido de hidrogênio

O H₂O₂ é produzido quando duas moléculas de O₂⁻ reagem com dois H⁺, esta reação pode acontecer espontaneamente ou catalisada por ação da enzima superóxido dismutase (SOD), habitualmente presente nas células dos mamíferos. (VENDITTI et al, 2013; TURRENS, 2003; LAMBERT et al, 2004) (Figura 1).

Figura 1. Formação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a partir da reação entre dois íons superóxido (O₂⁻) e dois prótons de hidrogênio (H⁺).



Fonte: SILVA, 2016.

O H₂O₂ oriundo por dismutação do O₂⁻, por apresentar estabilidade em sua estrutura, não é considerado exatamente um radical livre. No entanto, é precursor na formação de uma potente ERO, o OH. Ademais, o H₂O₂ apresenta meia-vida longa e capacidade de se difundir por meio das membranas biológicas (FORD, 2004; TURRENS, 2003; GRIVEAU et al, 1997; BARREIROS et al, 2006).

1.1.2 Radical superóxido (O₂⁻)

O O₂⁻ é um radical livre formado a partir da reação entre um elétron livre e uma molécula de O₂, que é gerado principalmente durante a cadeia respiratória mitocondrial e, também, é o precursor da maioria das EROs, como demonstrado na Figura 2 (VENDITTI et al, 2013, TURRENS, 2003).

Figura 2. Reação entre uma molécula de oxigênio (O₂) e elétron livre promovendo a formação do radical superóxido (O₂⁻).



Fonte: SILVA, 2016.

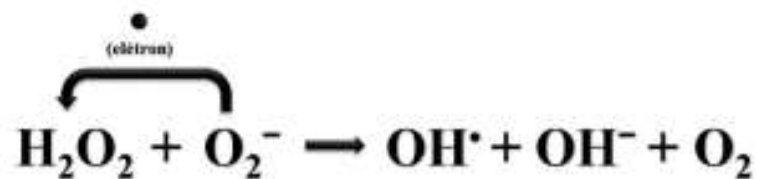
A maior parte do O_2^- é produzido dentro da matriz mitocondrial, este radical livre não consegue atravessar as membranas lipídicas e tem vida curta sendo imediatamente convertido, por ação enzimática, à H_2O_2 (MAIA et al., 2009; LENA, 2001; NOGUEIRA et al., 2013).

1.1.3 Radical hidroxil (OH^-)

O OH^- é apresentado como um dos mais potentes agentes oxidantes, que é capaz de atravessar membranas e reagir com várias moléculas, como lipídeos insaturados das membranas e DNA. Ele é oriundo a partir do H_2O_2 e a estrutura é constituída por um átomo de hidrogênio ligado a um átomo de oxigênio, onde um dos elétrons do O_2 encontra-se desemparelhado (PRYOR et al., 1986; PASTOR et al., 2000; TURRENS, 2003).

O H_2O_2 é apontado como um dos mais potentes agentes oxidantes, que possui capacidade de atravessar membranas e reagir com moléculas, tais como lipídeos insaturados das membranas e DNA. Este é sintetizado a partir do H_2O_2 e sua estrutura é formada por um átomo de hidrogênio ligado a um átomo de oxigênio, onde um dos elétrons do O_2 encontra-se desemparelhado (TURRENS, 2003). Este radical é oriundo da reação de reação de Haber-Weiss (Figura 3) (FORD, 2004; GRIVEAU et al., 1997).

Figura 3. Uma molécula de H_2O_2 recebe um elétron proveniente do O_2^- , denominada de Reação de Haber-Weiss.



Fonte: SILVA, 2016.

As novas descobertas sobre os efeitos da criopreservação de espermatozoides, resultaram no desenvolvimento de técnicas e métodos de criopreservação, em que diferentes proteínas, antioxidantes e agentes crioprotetores

estão sendo incorporados ao meio de congelação para aumentar a criossobrevivência dos espermatozoides (HEZAVEHEI et al., 2018).

1.2 Quercetina

A quercetina (3, 5, 7, 3'-4'-pentahidroxi-flavona) é comumente encontrada em vegetais, grãos, frutas, flores, chás (GARGOURI et al., 2011). Ela é conhecida por ser uma excelente agente com qualidades terapêuticas tais como, antineoplásica, antiarrítmica, antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória e antioxidante (KELLY, 2011). Além do mais, possui a capacidade de se ligar a substâncias tais como, transportadores de hormônios, enzimas, proteínas e DNA (ALRAWAIQ e ABDULLAH, 2014).

Ela é um flavonoide do grupo dos compostos polifenólicos, considerada como um antioxidante natural não enzimático (LIU et al., 2010). Os antioxidantes não enzimáticos são substâncias de baixo peso molecular que agem como removedores dos agentes causadores dos danos oxidativos ou como reparadores da lesão já estabelecida. Estes são de origem natural, normalmente oriunda de vegetais, ou de origem sintética (ANDRADE et al., 2010).

Dentre os flavonoides, a quercetina se sobressai por ter maior bioatividade que os outros, a exemplo da rutina. Ela é insolúvel em éter e outros solventes apolares. Por isso, sua dissolução quando, em pó, é realizada na presença de bases (GARGOURI et al., 2011).

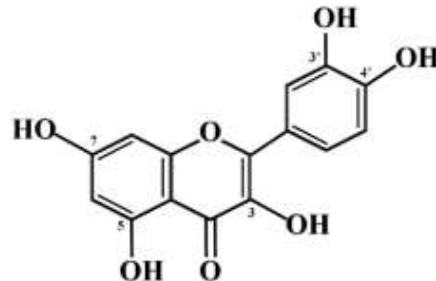
As qualidades antioxidante e antirradicalar estão diretamente ligadas à estrutura molecular, que são alteradas de acordo com a adição e a posição de determinados grupos funcionais. Quanto maior a quantidade de hidroxilas livres, maior será a atividade antirradicalar ou redutora do flavonoide (SÁ, 2013).

1.2.1 Ação da quercetina

A quercetina apresenta três importantes elementos estruturais que estão ligados com sua ação antioxidante. Um deles é a existência do grupo catecol, causador da formação de radicais fenoxil, estáveis após a doação de hidrogênio; uma dupla ligação entre os carbonos, que estão em conjugação como o grupo 4-carbonil, permitindo a saída a elétron do radical fenoxil; um grupamento 3-OH combinado com

uma dupla ligação entre carbonos, resultando na estabilização dos elétrons que foram reorganizados na molécula (SILVA e GUERRA, 2012).

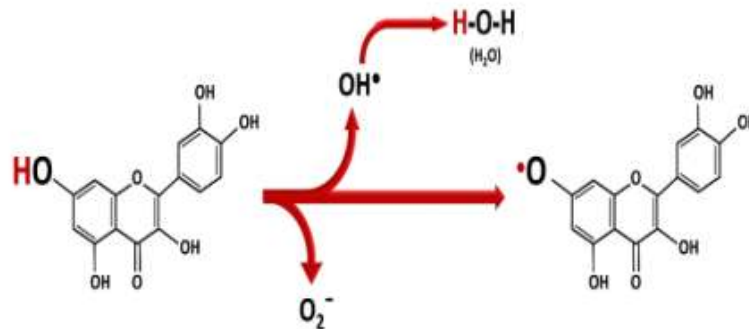
Figura 4. Estrutura molecular da quercetina.



Fonte: SILVA, 2016.

O mecanismo de ação da quercetina acontece em três etapas distintas: na interação com íons superóxido; na formação de radicais hidroxila, por quelar íons ferro; e na peroxidação lipídica, por reagir com radicais de peróxido de lipídios (AFANAS'EV et al., 1989).

Figura 5. Representação esquemática da ação da quercetina estabilizando os radicais superóxido (O_2^-) ou radical hidroxil (OH^\bullet).



Fonte: SILVA, 2016.

1.2.2 Estudos sobre os efeitos da quercetina

A quercetina tem atraído bastante atenção de pesquisadores por suas propriedades antioxidantes, biológicas e farmacológicas (MALEKIA et al., 2019; MUTHA et al., 2021).

A quercetina apresenta efeitos benéficos nos parâmetros espermáticos (motilidade progressiva, viabilidade, anormalidade, integridade da membrana, dano à cromatina, apoptose e ultra-estrutura) e, também, possui capacidade antioxidante total e a peroxidação lipídica no plasma seminal pós-descongelamento (SOBEH et al., 2017).

Uma pesquisa feita por Silva (2016) apontou que a inclusão da quercetina ao diluente, possibilita às células espermáticas maior resistência aos danos oxidativos, quando submetidas a uma situação de elevado estresse, visto que contribui para diminuir a concentração das EROs e ocorrência de peroxidação lipídica.

Outro estudo executado por Tironi et al (2019), concluiu que a adição da quercetina no diluente seminal, levou ao aumento na velocidade do espermatozoide e, quando comparado ao grupo controle, os espermatozoides mantiveram taxa metabólica mais alta, após o processo de descongelamento.

1.3 Albumina

Devido à sua natureza fenólica, os flavonoides são bastante polar, mas pouco solúvel em água e sua absorção pode ser escassa (VAN ACKER et al., 1996; NAMAKA, 2008). No entanto, uma série de investigações bioquímicas e biológicas moleculares revelaram que as proteínas, como a albumina, são frequentemente “alvos” para flavonoides terapeuticamente ativos de origem natural e sintética, ou seja, tem a facilidade de se ligarem melhorando a absorção, sendo a quercetina um exemplar (LAMSON et al., 2000).

1.4 Pluronic® F-127

Pluronic é um dos nomes comerciais dos Poloxamers, copolímeros tribloco com estrutura “ABA” onde dois blocos de poli-óxido de etileno estão divididos por um bloco de poli-óxido de propileno (BATRAKOVA et al., 2009).

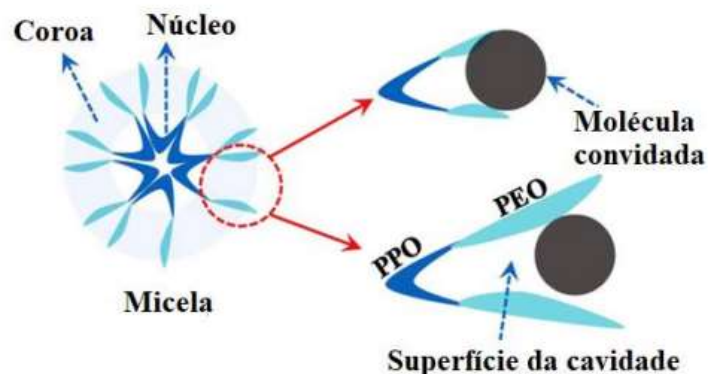
Copolímeros em bloco com caráter anfifílico formam micelas, que tem a habilidade de se combinar com o fármaco e otimizar a solubilidade, a estabilidade, a permeabilidade, controlar a liberação e proteger o fármaco (KABANOV et al., 2002; ALIABADI e LAVASANIFAR, 2006; MUELLEN et al., 2009).

A letra que aparece antes da numeração apresenta o estado físico em que o Pluronic é comercializado, em forma líquida (L), forma de pasta (P) e em forma de

flocos (F). Enquanto os números são indicativos da composição estrutural do Pluronic, sendo que os dois primeiros dígitos mostram informação sobre a massa molecular da porção hidrofóbica (PPO) do Pluronic, e a fração hidrofílica (PEO) que compõe a estrutura pode ser encontrada pela multiplicação do último dígito por 10 (KABANOV et al., 2002).

Tal automontagem em solução aquosa permite ao Pluronic uma estrutura formada por uma coroa hidrofílica (grupos PEO) e um núcleo composto pelos grupos hidrofóbicos (PPO). A proposta de mecanismos de redução das nanopartículas por meio do Pluronic é dado exatamente nesta estrutura, já que de acordo com a literatura a formação de nanopartículas por meio do Pluronic pode seguir três etapas com papéis diferentes para cada fração da cadeia. Na primeira etapa, os íons de metal são reduzidos por contribuição dos grupos hidrofílicos. Depois disso, os núcleos sintetizados sofrem a adsorção do polímero em sua superfície por ação dos grupos hidrofóbicos. Em uma terceira e última etapa, as nanopartículas são favorecidas, estabilizadas e tem seu crescimento determinado pela dimensão de cadeia do grupo hidrofóbico (ALEXANDRIDIS e TSIANOU, 2011).

Figura 6. Estrutura da micela do Pluronic durante o processo de formação das nanopartículas.



Fonte: KHULLAR et al., 2010.

Como a quercetina é considerada lipofílica (NEMETH e PISKULA, 2007), a característica interessante do Pluronic, neste caso, é a automontagem em estruturas similares a micelas, quando é atingida uma concentração limite, conhecida como concentração micelar crítica (CMC), que é diferente para cada Pluronic que depende

do balanço lipofílico e hidrofílico da cadeia. No caso do Pluronic® F-127, a nomenclatura indica que ele se apresenta na forma de floco e 70% da sua estrutura é composta pelo monômero hidrofílico e o restante hidrofóbico (ALEXANDRIDIS e TSIANOU., 2011).

Levando-se em conta a função da quercetina, o objetivo do trabalho foi avaliar se a adição da albumina e do Pluronic® F-127 nas soluções de diferentes tratamentos, leva ao aumento da ação da quercetina na viabilidade dos espermatozoides criopreservados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta de sêmen

Foram coletados sêmen de vinte touros, pertencentes a uma Fazenda na cidade de Alto Paraíso, Paraná, Brasil. Após a ejaculação, o sêmen foi analisado no microscópio, os ejaculados que obtiveram padrão de no mínimo 70% de motilidade progressiva, vigor 3 e no máximo 30% de alterações na morfologia espermática, estes foram selecionados.

Os bovinos que obtiveram o padrão mínimo para a seleção, foram seis touros Zebuínos. Estes animais estavam em atividade sexual, à pasto e com faixa etária média de seis anos. A coleta de sêmen foi feita por meio do eletroejaculador, foi coletado uma dose por touro e seguiu a recomendação do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal CBRA (2013).

2.2 Congelação e descongelação do sêmen

O ejaculado de cada animal foi dividido em cinco tratamentos, sendo o Tratamento 0, o controle; Tratamento 1, a quercetina; Tratamento 2, a quercetina e albumina; Tratamento 3, a quercetina e Pluronic® F-127; Tratamento 4, a quercetina, albumina e Pluronic® F-127. Sendo assim, totalizando 180 palhetas.

O ejaculado de cada touro foi diluído em TRIS-gema (HAFEZ, 1995), e divididos em cinco tratamentos, sendo envasados seis palhetas por tratamento, com concentração ajustada para 10 milhões de espermatozoides (CBRA, 2013).

As palhetas foram refrigeradas em temperatura de 5°C durante 4 horas, e então colocadas no vapor de nitrogênio, durante cinco minutos, sob curva de resfriamento

de 0,47°C/min, quando foram mergulhadas em nitrogênio líquido -196°C, e acondicionadas no botijão de sêmen.

Para a descongelação do sêmen, colocou-se as palhetas em banho-maria a 38°C por 50 segundos (BITTENCOURT, 2009). Onde o conteúdo da palheta foi colocado no eppendorf na temperatura de 36°C por 30 segundos. Depois disso, foi feito a análise espermática, com auxílio de um equipamento de Sistema Computadorizado de Análise de Espermatozoides (HAMILTON TORNE IVOS II), para verificação da cinética espermática.

2.3 Sistema Computadorizado de Análise de Espermatozoides (CASA)

A análise computadorizada foi realizada no Laboratório de Reprodução Animal-LABRA, da Universidade Federal da Fronteira Sul– UFFS, Campus Realeza, com a utilização do sistema automatizado Computer Assisted Semen Analysis (CASA) para avaliações seminais pós-descongelação (HAMILTON THORNE IVOS II), que visualiza, digitaliza e analisa imagens de espermatozoides sucessivas, fornecendo assim informações precisas e significativas sobre a cinética celular individual, bem como valores resumidos da população global.

Para a análise, amostra de sêmen descongelada foi imediatamente analisada, após diluição em em 100uL de citrato de sódio e 250uL do conteúdo da palheta. Depois disso foi pipetado 3 µL dessa diluição e colocado em cada uma lâmina específica para avaliação no CASA (LEJA®).

Uma câmara de leitura de cada lâmina foi usada, e três campos distintos de cada amostra foram automaticamente registrados e avaliados através do microscópio e sistema do CASA.

Os seguintes parâmetros foram avaliados: motilidade total (%), motilidade progressiva (%), velocidade curvilínea, (VCL; µm/ s), velocidade em linha reta (VSL; µm·s⁻¹), velocidade média do caminho (VAP; µm· s⁻¹), distância curvilínea (DCL; µm), distância reta (DSL; µm), distância média percorrida (DAP; µm), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH; µm), frequência de batimento cruzado (BCF; Hz) , oscilação (WOB; [VAP / VCL] × 100) e linearidade (LIN; [VSL / VCL] × 100).

Os dados foram analisados utilizando o PROC MIXED do SAS (versão 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC), utilizando também o Teste de Tukey, com significância de $p \leq 0,05$.

3 RESULTADOS

A tabela 1 apresenta os valores médias, seguidos pelo erro padrão, dos parâmetros espermáticos avaliados nos diferentes tratamentos.

Tabela 1. Parâmetros da cinética espermática (média \pm erro padrão) no sêmen de touros submetidos a diferentes tratamentos.

Parâmetros	Tratamentos				
	0	1	2	3	4
Motilidade total (%)	11,05 \pm 1,6 ^d	8,13 \pm 1,65 ^{acd}	12,91 \pm 1,53 ^{bd}	11,17 \pm 1,60 ^d	7,90 \pm 1,58 ^{acd}
Motilidade progressiva(%)	4,55 \pm 0,82	4,41 \pm 0,84	5,78 \pm 0,76	5,47 \pm 0,81	3,75 \pm 0,76
DCL (mm)	45,06 \pm 3,81	45,66 \pm 3,93	43,64 \pm 3,93	47,01 \pm 3,81	40,49 \pm 3,75
DSL (mm)	17,02 \pm 1,91	18,51 \pm 1,97	17,73 \pm 1,83	18,72 \pm 1,91	16,61 \pm 1,88
DAP (mm)	24,33 \pm 2,05	24,86 \pm 2,12	24,25 \pm 1,96	25,67 \pm 2,05	22,72 \pm 2,02
VCL (mm \cdot s ⁻¹)	114,60 \pm 6,59	129,63 \pm 6,80	130,09 \pm 6,31	134,75 \pm 6,59	119,63 \pm 6,49
VSL (mm \cdot s ⁻¹)	53,98 \pm 3,15	55,35 \pm 3,25	57,80 \pm 3,02	58,83 \pm 3,15	54,59 \pm 3,10
VAP (mm \cdot s ⁻¹)	74,51 \pm 3,60	75,74 \pm 3,72	79,23 \pm 3,45	78,54 \pm 3,60	75,65 \pm 3,55
BCF (Hz)	33,29 \pm 2,10	34,92 \pm 2,16	30,35 \pm 2,01	31,84 \pm 2,10	34,63 \pm 2,07
ALH (mm)	10,47 \pm 0,43	10,28 \pm 0,45	10,04 \pm 0,42	9,80 \pm 0,43	10,48 \pm 0,43
LIN (VSL/VCL)	64,58 \pm 3,90	70,24 \pm 4,02	75,03 \pm 3,73	76,23 \pm 3,90	69,93 \pm 3,84
WOB (VAP/VCL)	58,99 \pm 1,58	57,49 \pm 1,63	61,40 \pm 1,51	58,05 \pm 1,58	60,05 \pm 1,56

Valores seguidos por letras diferentes, diferem-se ($p \leq 0,05$). Fonte: O autor.

Observou-se que a motilidade total (%), apresentou diferença entre o tratamento 2, tratamento 1 e tratamento 4, sendo o tratamento 2 (quercetina e albumina) o que apresentou melhor resultado ($p \leq 0,05$). No entanto, em relação ao parâmetro da motilidade total (%), não teve diferença estatística entre o tratamento 0 (controle) e tratamento 2. Em relação aos outros parâmetros, motilidade progressiva (%), DCL, DAP, BCF, LIN, WOB, VSL e VAP não indicaram diferença estatísticas, entre os tratamentos ($p > 0,05$).

4 DISCUSSÃO

A motilidade espermática é um dos principais parâmetros utilizados antes e após a congelação do sêmen, para avaliar tanto a qualidade, quanto a capacidade de fertilização do espermatozoide (SIMONIK et al., 2015). Com isso, pode-se visualizar a importância que teve a suplementação de quercetina e albumina, uma vez que esse parâmetro apresentou diferença estatística.

Os outros parâmetros avaliados pelo Sistema Computadorizado de Análise de Espermatozoides (CASA) - como a velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL), velocidade média do caminho (VAP), distância curvilínea (DCL), distância reta (DSL), distância média percorrida (DAP), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento cruzado (BCF), oscilação (WOB) e linearidade (LIN), motilidade progressiva (%) - não apresentaram valores de diferença significativa, demonstrando assim que os tratamentos testes foram tão eficazes quanto ao diluente convencional (TRIS-gema).

Reis et al. (2023), relataram que, embora os achados sejam significativamente os mesmos, o fato do padrão seminal dos animais utilizados serem bons, mascara os resultados, que provavelmente teriam uma ação melhor, se o sêmen analisado fosse de baixo desempenho na criopreservação, oferecendo um desafio maior para o antioxidante testado. Isto justifica o fato da maioria dos parâmetros não terem diferença estatística entre si, uma vez que a qualidade seminal avaliada foi de ótima qualidade.

Segundo o estudo realizado por Tironi et al. (2019), relataram que ao adicionar quercetina ao diluente seminal antes da congelação, observou-se uma melhor qualidade dos espermatozoides que se manifesta com o gameta masculino mais rápidos, podendo aumentar as taxas de fertilização. Sendo que a capacidade de fertilização do espermatozoide pode ser avaliada por vários parâmetros, principalmente o VCL. Na referente pesquisa, todas as velocidades avaliadas pelo programa CASA aumentaram na condição em que tinha a quercetina, incluindo VCL, demonstrando a importância na suplementação em diluente seminal bovino. Entretanto, na presente pesquisa, os parâmetros como VCL, VAP e VSL não tiveram diferença estatística.

Os dois grupos de pesquisadores, Tironi et al. (2019) e Reis et al. (2023), afirmaram que a suplementação de quercetina, no diluente seminal, melhora a LIN,

no entanto o Tratamento 1 (quercetina) não apresentou ter qualidade superior em comparação com os demais tratamentos testados.

A albumina é encontrada no plasma seminal, sendo importante por ter ação de antioxidante não enzimático (AGARWAL et al., 2008) e, também, tem facilidade de se ligarem com flavonoides, como a quercetina (LAMSON et al., 2000). Correlacionando com o resultado obtido pelo presente estudo, já que em relação à motilidade total, o tratamento 2, que continha quercetina e albumina, teve um melhor resultado.

Shirky et al., (2020) utilizou Pluronic® F-127 pra formar micelas e assim liberar o fármaco hidrofóbico lentamente, visando reduzir os efeitos colaterais. Até o momento, não há relato deste copolímero utilizado para a criopreservação do sêmen bovino, mas devido a característica hidrofóbica da quercetina, foi avaliado se o Pluronic® F-127 melhoraria a distribuição deste antioxidante, entretanto não houve diferença estatística Tratamento 3 e 4, que continha este copolímero.

5 CONCLUSÃO

A adição de quercetina e albumina ao meio de congelação (TRIS-gema) do sêmen bovino altera a motilidade total após descongelar. Entretanto, não houve diferença estatística com o tratamento controle, sendo necessário mais estudos com a suplementação de quercetina e albumina.

6 REFERÊNCIAS

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

AGARWAL A, MAKKER K, SHARMA R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. **American Journal of Reproductive Immunology**. v.59, p.2-11, 2008.

ALEXANDRIDIS, P.; TSIANO, M. "Block Copolymer-Directed Metal Nanoparticle Morphogenesis and Organization". **Eur. Polym. J.** v. 47 n. 4, pp.569–583, 2011.

ALIABADI e LAVASASNIFAR, Polymeric micelles for drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v.3, n.1, p. 139-162, 2006.

ALRAWAIQ, N.S.; ABDULLAH, A. A review of flavonoid quercetin: metabolism, bioactivity and antioxidant properties. **International Journal of Pharm Tech Research**, v.6, p.933-941, 2014.

AMIDI, F.; PAZHOHAN, A.; SHABANI NASHTAEI, M.; KHODARAHMIAN, M.; NEKOONAM, S. The role of antioxidants in sperm freezing: A review. **Cell Tissue Bank**, v.17, p. 745–756, 2016.

ANDRADE, E.R.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.34, p.79-85, 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES (ABIEC). Sumário 2018. Disponível em:<<http://abiec.siteoficial.ws/images/upload/sumario-pt-010217.pdf>>. Acesso em: 08/04/2023.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (ASBIA). Index ASBIA Mercado, 2019. Disponível em:<<https://www.lancerural.com.br/vendas-de-semen-bovino-crescem-no-1o-semester-de-2018/presidente-da-asbiasergio-saud-anuncia-aumento-nas-vendas-de-semen/>>. Acesso em: 20/03/2023.

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

BARUSELLI, P.S. **Avaliação do mercado de IATF no Brasil**. Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal/FMVZ/USP, 1. ed., 2019a. Disponível em: <<http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/>>. Acesso em: 21/03/2023.

BARUSELLI, P.S.; FERREIRA, R.M.; SÁ FILHO, M.F.; BÓ, G.A. Review: Using artificial insemination v. natural service in beef herds. **Animal**, v.12, p.45-52, 2018.

BATRAKOVA, E.V.; KABANOV, A.V. "Pluronic Block Copolymers: Evolution of Drug Delivery Concept from Inert Nanocarriers to Biological Response Modifiers". **J Control Release**. v. 130 n. 2, pp.98–106, 2009.

BITTENCOURT, R. F. **Viabilidade e fertilidade do sêmen ovino criopreservado com glicerol ou dimetilacetamida em meio com trealose e EDTA**. (tese). (Botucatu): Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 200 p. 2009.

BOZZI, A. R.; PARTICELLI, L. H.; VIANA, C. H. C.; QUIRINO, C. R.; DE ANDRADE, A. F. C.; DE FREITAS, F. V.; PASSARELLI, M. S.; CELEGHINI, E. C. C.; BEDOYA, H. J. N.; CHAYCANUL, A. J.; DA COSTA, R. L. D. Adição de sucos de laranja, abacaxi e beterraba em diluidor para criopreservação de sêmen de carneiros. **Ciência Animal Brasileira**, v. 24, 2023.

CÂMARA, D. R.; GUERRA, M. M. P. Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.1, p.33-40, jan/mar. 2011.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. Belo Horizonte, MG. 3ª ed. 45p, 2013.

CONDESSA, M.A.K.V; PIMENTEL, A.L.; SEIXAS, F.A.V.; MARTINEZ, A.C. Purification, structural and biophysical characterisation of the major seminal plasma protein from Texel rams. **Anim Reprod Sci**. v. 189, p.11-18, 2018.

EZZATI, M.; SHANEHBANDI, D.; HAMDI, K.; RAHBAR, S.; PASHAIASL, M. Influence of cryopreservation on structure and function of mammalian spermatozoa: An overview. **Cell Tissue Bank**, v.21, p. 1–15, 2020.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Cenário da demanda por alimentos no Brasil, 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/brasil/noticias/detailevents/en/c/901168/>>. Acesso em: 16/02/2023.

FORD, W.C.L. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. **Human Reproduction Update**. v.10, p.387-399, 2004.

GARGOURI, B.; MANSOUR, R.B.; ABDALLAH, F.B.; ELFEKIH, A.; LASSOUED, S.; KHALED, H. Protective effect of quercetina against oxidative stress caused by dimethoate in human peripheral blood lymphocytes. *Lipids Health Diseases*, v. 10, p. 149, 2011.

GRAHAM, J. K. Response of spermatozoa to freezing. In: techniques for handling and utilization of transported cooled and frozen equine spermatozoa. **Proceedings**. Equine Sciences. Colorado State University Fort Collins, Colorado. USA. p.83-95, 1995.

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

HAFEZ, E.S.S. **Reprodução animal**. 6ª ed. São Paulo, Brasil: Editora Manole, 1995.

HEZAVEHEI, M.; SHARAFI, M.; KOUCHESFAHANI, H.M.; HENKEL, R.; AGARWAL, A.; ESMAEILI, V.; SHAHVERDI, A. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. **Reprod. Biomed**. v.37, p.327–339, 2018.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Sistema de Recuperação Automática (SIDRA) Efetivo do Rebanho Brasileiro**, 2018. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>>. Acesso em: 12/03/2023.

KABANOV, A. V; LEMIEUX, P.; VINOGRADOV, S.; ALAKHOV, V. "Pluronic ® Block Copolymers : Novel Functional Molecules for Gene Therapy". **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 54, p.223–233, 2002.

KHULLAR, P.; MAHAL, A.; SINGH, V.; BANIPAL, T. S.; KAUR, G.; BAKSHI, M. S. "How PEO-PPO-PEO Triblock Polymer Micelles Control the Synthesis of Gold Nanoparticles: Temperature and Hydrophobic Effects". **Langmuir**. v. 26 n. 13, pp.11363–11371, 2010.

KUMAR, A.; PRASAD, J.K.; SRIVASTAVA, N.; GHOSH, S.K. Strategies to minimize various stress-related freeze–thaw damages during conventional cryopreservation of mammalian spermatozoa. **Biopreserv. Biobank**, v.17, p.603–612, 2019.

LAMB, G.C.; MERCADANTE, V.R.G. Synchronization and artificial insemination strategies in beef cattle. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v.32, p.335-334, 2016.

Lambert AJ, Brand MD. Superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane. **Biochemical Journal**. v.382, p.511-517, 2004.

LAMSON, D.W.; BRIGNALL, M.S. **Altern. Med. Rev.** v.5, p.196–208, 2000.

Lenaz G. The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life**. v.52, p.159-164, 2001.

LENZI, A.; GANDINI, L.; PICARDO, M.; TRAMER, F.; SANDRI, G.; PANFILI, E. Lipoperoxidation damage of spermatozoa polyunsaturated fatty acids (PUFA): scavenger mechanisms and possible scavenger therapies. **Frontiers in Bioscience**. v.5, p.1-15, 2000.

LIMA, F.S.; VRIES, A.D.E.; RISCO, C.A.; SANTOS, J.E.P.; THATCHER, W.W. Economic comparison of natural service and timed artificial insemination breeding programs in dairy cattle. **J Dairy Sci**, v.93, p.4404-4413, 2010.

LIU, S.; HOU, W.; YAO, P. et al. Quercetin protects against ethanol-induced oxidative damage in rat primary hepatocytes. **Toxicol. In vitro**. v.24, p.516-522, 2010.

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

MALEKIA, S. J.; CRESPO, J. F.; CABANILLAS, B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. **Food Chemistry**, v. 299, p. 1-11, 2019.

MUELLEN et al. **Targeted block copolymer micelles**. European Patent Office, EP 2025348 A1 20090218, 2009.

MUTHA, R. E.; TATIYA, A. U.; SURANA, S. J. Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: an overview. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 1, p. 7-25, 2021.

NAMAKA, M.; CROOK, A.; DOUPE, A.; KLER, K.; VASCONCELOS, M.; KLOWAK, M.; GONG, Y.; WOJEWNIK-SMITH, A.; MELANSON, M. **Neurol Res**, v.30, p. 710–719, 2008.

NEMETH, K., & PISKULA, M. K. Food Content, Processing, Absorption and Metabolism of Onion Flavonoids. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.47, n.4, p.397–409, 2007.

NOGUEIRA, B.G.; BITENCOURT, J.L.; SAMPAIO, B.F.B.; BENDER, E.S.C.; COSTA E SILVA, E.V.; ZÚCCARI, C.E.S.N. Peroxidação lipídica e agentes antioxidantes no sêmen de mamíferos. **Revista Eletrônica Veterinária**. v.15, p.1-15, 2013.

PASTOR, N.; WEINSTEIN, H.; JAMISON, E.; BRENOWITZ, M. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence specific binding. **Journal of Molecular Biology**, v.304, p.55- 68, 2000.

PRYOR, W.A. Oxy–radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. **Annual Review of Physiology**, v.48, p.657-667, 1986.

REIS, W.V.A.; PEREIRA, R.R.; VIEIRA JUNIOR, M.; CUNHA, C.C.T.; ACÁCIO, B.R.; MACEDO, G.G.; COSTA-E-SILVA, E.V.; SAMPAIO, B.F.B. Impact of quercetin, carnosine, and ozone in the cryopreservation on Nellore (*Bos indicus*) semen. **Anim Reprod.**; v.20, p.1-10, 2023.

SÁ, L.Z.C. M. **Determinação eletroanalítica e espectrofotométrica da atividade antioxidante de fermentados de jabuticaba e vinhos de diferentes procedências**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

SAALU, L. O papel incriminador das espécies reativas de oxigênio na infertilidade masculina idiopática: uma evidência baseada avaliação. **Jornal Paquistão de Ciências Biológicas**, v.13, p.413, 2010.

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

SILVA, Luis Fernando Mercês Chaves. **Estudo sobre a redução do estresse oxidativo em sêmen Equino a partir da adição de quercetina nos diluentes de refrigeração e congelamento**. Orientador: Frederico Ozanam Papa. 2016. 94 f. Tese (Mestrado em Biotecnologia Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Botucatu. 2016.

SIMONIK, O., SICHTAR, J., KREJCARKOVA, A., RAJMON, R., STADNIK, L., BE DOLEZALOVA, M., BONIOVA, Z. Computer assisted sperm analysis – the relationship to bull field fertility, possible errors and their impacto on outputs: a review. **Indian Journal of Animal Science**. v.85, p.3-11, 2015.

SOBEH, M.; HASSAN, S.A.; EL RAEY, M.A.; KHALIL, W.A.; HASSAN, M.A.E.; WINK, M. Polifenóis de *Albizia harveyi* exibem atividades antioxidantes e neutralizam os

danos oxidativos e as alterações ultra-estruturais do sêmen de touro criopreservado. **Moléculas**, v.22, n.11, p.1-14, 2017.

TIRONI, S.M.T.; MARTINEZ, A. C.; SEIXAS, F.A.V.; STEFANELLO, T. F.; NAKAMURA, C.V.; MORAES, G.V. Effects of Treatment with Quercetin on the Quality of Cryopreserved Bovine Semen. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.47, p.1635, 2019.

TONIOLLI, Ricardo; COSTA, Jonathan Maia da Silva. Reactive oxygen species, antioxidants and their implications for the quality of cryopreserved semen in domestic mammals. **Investigação**. Fortaleza. v.16, n.8, p.22-29, 2017.

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

UPADHYAY, V. R., RAMESH, V., DEWRY, R. K., KUMAR, G., RAVAL, K., PATPLIYA, P. Implications of cryopreservation on structural and functional attributes of bovine spermatozoa: An overview. **Andrologia**, v.53, n.8, 2021.

VAN ACKER, S. A. B. E.; VAN DEN BERG, D. J.; TROMP, M. N. J. L.; GRIFFIOEN, D. H.; VAN BENNEKOM, W. P.; VAN DER VIJGH, W. J. F.; BAST, A. **Free Radic Biol Med**, v. 20, p. 331–342, 1996.

VENDITTI, P.; DI STEFANO, L.; DI MEO, S. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. **Mitochondrion**. v.13, p.71-82, 2013.