

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

**Centro de Desenvolvimento Tecnológico**

**Curso de Biotecnologia**



**Trabalho de Conclusão de Curso**

**Efeito dos compostos fenólicos Quercetina e Kaempferol sobre a função  
espermática bovina**

**Larissa Oliveira Daneluz**

Pelotas, 2016

**LARISSA OLIVEIRA DANELUZ**

**“Efeito dos compostos fenólicos Quercetina e Kaempferol sobre a  
função espermática bovina”**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Bacharelado  
em Biotecnologia da Universidade  
Federal de Pelotas, como requisito  
parcial à obtenção do título de Bacharel  
em Biotecnologia.

Orientador Acadêmico: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Priscila Marques Moura de Leon

Orientador de Estágio: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção

Pelotas, 2016.

Dados de catalogação na fonte:  
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901  
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

D179e      Daneluz, Larissa Oliveira  
              Efeito dos compostos fenólicos Quercetina e Kaempferol  
              sobre a função espermática bovina / Larissa Oliveira Daneluz. –  
              79f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em  
              Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de  
              Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2017. – Orientadora  
              Priscila Marques Moura de Leon ; orientadora Mayra Elena Ortiz  
              D'Ávila.

              1.Biotecnologia. 2.EROS. 3.Citometria. 4.CASA.  
              5.Motilidade espermática. I.Leon, Priscila Marques Moura de.  
              II.D'Avila, Mayra Elena Ortiz. III.Título.

CDD: 571.8451

Larissa Oliveira Daneluz

Efeito dos compostos fenólicos Quercetina e Kaempferol sobre a função  
espermática bovina

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para  
obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Graduação em  
Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 02/12/2016

BANCA EXAMINADORA:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Priscila Marques Moura de Leon

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

.....

MSc. William Borges Domingues

Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

.....

MSc. Tony Leandro Rezende da Silveira

Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pelotas

.....

Dr<sup>a</sup>. Karina Lemos Goularte

Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

.....

"Ah! A estrada é comprida e andar vale a  
pena Pois quem busca sonhos de alma  
serena Tocando pra frente sabe aonde vai...."

(Pirisca Grecco)

## Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Ivan e Andréa. Não foram apenas pais, mas amigos e companheiros. Mesmo nas horas em que meus ideais pareciam distantes e inatingíveis, vocês sonharam comigo os meus sonhos. À vocês, todo amor que houver nessa vida.

Às minhas irmãs, Marina e Millena. Nós três, amor eterno! Malami ♥ Obrigada por serem suporte quando parece faltar chão. Vocês são as melhores irmãs que Deus poderia me dar. “Afeto, certamente. Cumplicidade? Mais do que cumplicidade. Sintonia? Acho que é amor.”

Aos meus avós, Silmar, Marília, Loirena e Geraldo (*in memoriam*) por todo carinho, amor e cuidado. Amo vocês infinitamente!

Ao Otávio, por ser meu companheiro durante os 2 anos de faculdade! “Parece que tem gente que vem ao mundo com paz no abraço e luz no sorriso. Ao lado delas, a gente não acha que o amor é possível... a gente tem certeza!” Te amo!

Ao Yeye por ser um tio amigo, parceiro e que transborda alegria pra nossa vida.

À dinda Graciela, por ser mais que uma dinda e saber o jeito perfeito de estar junto mesmo estando longe e sonhar junto todos nossos sonhos.

À minha melhor amiga, Ju Echenique, por estar tão “perto” mesmo morando tão longe e ser um anjo na minha vida. Obrigada pelos incentivos quase que diários há mais de 7 anos! Te amo xuja!!!

À minha amiga de infância, Raquel. Obrigada por compartilhar todos momentos, sejam bons ou ruins. Não é por nada que fizemos a mesma faculdade! Vou te levar pra sempre comigo (e sem brigarmos). Te amo!

À amiga que a faculdade me deu e que eu amo muito, Nati. Tão diferentes e tão iguais, nossa amizade é linda! Obrigada pela parceria nos estudos, na vida e por tudo que passamos juntas nesses anos de Biotec.

Ao meu trio: Camilinha e Nani. Minhas amigas do coração que me dão força e alegria! Amo vocês!

À Elisa e Nica, obrigada por todo apoio e carinho! Vocês estão guardadinhas num lugar especial no meu coração. Amo muito vocês e amo nossa amizade!

À Bruna (ou melhor, mãe Bruna em São Paulo), foste uma amigona muito especial durante o período de realização desse trabalho. Tenho um carinho muito grande por ti! Obrigada por tudo!!

À minha comadre e amiga que a vida me presenteou, Ju! Nossas conversas e fotos quase que diárias me ajudaram a não desistir por estar tão longe. Minhas afilhadinhas Antonella e Sophia, a didi ama vocês!

Aos amigos que fiz na Biotec: Camis, Mica, Rodrigo, Pedro, Júlia, Cleomar. Obrigada por todas risadas e momentos bons que tivemos nesses 4 anos! Obrigada até pelas brigas, elas nos fizeram ser pessoas melhores, com certeza!

À minha querida orientadora acadêmica Priscila Marques Moura de Leon, que se tornou muito mais que orientadora, virou minha amigona do coração! Muito obrigada por confiar no meu potencial e me ajudar em tudo. Me espelho na profissional que és! Agradeço também à minha orientadora de estágio Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção, por abrir as portas do seu laboratório pra mim e ser tão querida e gentil! A dedicação e competência com suas responsabilidades me fizeram ver em ti uma fortaleza de mulher!

À Universidade Federal de Pelotas e aos professores do Núcleo de Biotecnologia do CDTec, pela dedicação em capacitar seus estudantes.

Ao Laboratório Biosptz por terem me acolhido com muito carinho! Obrigada por toda ajuda e ensinamentos, sem vocês a realização desse trabalho não seria possível! Le, Dri, Lu, Ca, Vi, Tha e Robinson obrigada pelos 4 meses de risadas e aprendizados! (Sentirei saudades de todos! Não esqueçam da “larica” e do “capiroto” hahahahah)

Agradeço também ao João Diego e Brunão, por estarem sempre dispostos e prestativos a me ajudar com as análises do CASA.

E, por fim, agradeço às instituições que contribuíram para a minha formação, a UFPel, o CDTec, a Biotecnologia e a FMVZ – USP.

## Resumo

DANELUZ, Larissa Oliveira. **Efeito dos compostos fenólicos Quercetina eKaempferol sobre a função espermática bovina.** 2016, 80f. TrabalhoAcadêmico – Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

Com o constante aumento do rebanho bovino no Brasil, o aprimoramento genético e o desenvolvimento de biotécnicas da reprodução tem sido foco de estudo como estratégia para maximizar a eficiência produtiva dos rebanhos. Sabe-se que a criopreservação de espermatozoides é uma biotecnologia muito utilizada e de extrema importância para programas de reprodução animal, porém constitui um evento atípico e estressante para as células espermáticas, com estímulo à alta geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que determina a redução da integridade estrutural e funcional dos espermatozoides e conseqüentemente, apresenta efeitos deletérios à célula. Em decorrência disto, grande atenção tem sido dada ao estudo sobre os sistemas de defesa antioxidantes exógenos, focado na aplicação de novas terapias antioxidantes utilizadas no sêmen criopreservado. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar, em sêmen bovino congelado, o efeito dos compostos fenólicos Quercetina e Kaempferol, sobre a função espermática, em condições de estresse oxidativo induzido. Para isso, foram utilizadas palhetas de sêmen criopreservado bovino, tratadas com concentrações crescentes dos compostos fenólicos Quercetina e Kaempferol separadamente (0,01, 0,1 e 1 µg/mL), incubados por 30 minutos à 37°C, juntamente com indutores de estresse oxidativo, Rotenona (400 nM) e Antimicina (400 nM). Posteriormente, avaliou-se parâmetros de motilidade espermática pelo sistema Computer Assisted Sperm Analysis. Seguido de análises no citômetro de fluxo Guava EasyCyte™ Mini System, onde 90.000 células totais em meio Fert-TALP de cada tratamento foram utilizados para as análises com sondas fluorescentes específicas para: potencial de membrana mitocondrial (JC-1), estresse oxidativo total (CellRox® Green), integridade de membrana plasmática e acrossomal (FITC/PI). Não foi possível identificar o efeito dose-dependente da adição das moléculas Quercetina e Kaempferol no sêmen congelado bovino para nenhum dos parâmetros espermáticos analisados. No entanto, foi possível verificar que as moléculas Quercetina e Kaempferol não apresentam atividade citotóxica à célula espermática bovina, pois não foi observada uma diminuição na viabilidade e na funcionalidade das células expostas aos compostos fenólicos. Estudos adicionais buscarão avaliar a atividade dos compostos fenólicos previamente à criopreservação, testando o efeito protetor das moléculas em sêmen bovino. É notória a necessidade da realização de estudos mais aprofundados a cerca do efeito dos antioxidantes sobre a sobrevivência e a funcionalidade dos espermatozoides, bem como das biotécnicas de manipulação e do processo de criopreservação espermática.

**Palavras-chave:** EROs; Motilidade espermática; Citometria; CASA

## Abstract

DANELUZ, Larissa Oliveira. **Efeito dos compostos fenólicos Quercetina eKaempferol sobre a função espermática bovina.** 2016, 80f. Trabalho Acadêmico – Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

The constant increasing on the bovine herd in Brazil, the genetic enhancement of the animals and improvement of existents reproduction biotechniques has been focus of study as a strategy to maximize the productive efficiency of the bovine herds. It is known that cryopreservation of spermatozoa is a very used biotechnology and extremely important for animal breeding programs, an atypical and stressful event for sperm cells, stimulating the high generation of reactive oxygen species (ROS), which determines the reduction of the structural and functional integrity of the spermatozoa and, consequently, has deleterious effects on the cell. As a result of this, greater attention has been given to the study on the exogenous antioxidant defense systems, focused on the application of new antioxidant therapies to be used in cryopreserved semen. The objective of the present study was to evaluate, on frozen sperm, the effects on sperm functions aplying phenolic compounds Quercetin and Kaempferol under induced oxidative stress. For this, bovine cryopreserved semen was treated with increasing concentrations of phenolic compounds Quercetin and Kaempferol separately (0.01; 0.1 and 1  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ), incubated for 30 minutes at 37°C, together with inducers of oxidative stress, Rotenone (400 nM) and Antimycin (400 nM). Subsequently, sperm motility parameters were evaluated by the Computer Assisted Sperm Analysis System. Followed by analyzes on the Guava EasyCyte™ Mini System Flow Cytometer, where 90.000 total cells in Fert-TALP medium from each treatment were used for analyzes with specific fluorescent probes for: mitochondrial membrane potential (JC-1), total oxidative stress (CellRox® Green), plasma membrane integrity and acrosomal membrane (FITC / PI). It was not possible to identify the dose-dependent effects with the addition of Quercetin and Kaempferol molecules on bovine frozen semen for no one of the analyzed sperm parameters. However, it was possible to verify that the Quercetin and Kaempferol molecules hadn't produced cytotoxic activity on bovine sperm cells and a decrease in the viability and functionality of the cells exposed to the phenolic compounds wasn't observed. Additional studies aim seek to evaluate the activity of phenolic compounds prior to cryopreservation by testing the protective effect of the molecules on bovine semen. The need for more in-depth studies on the effect of antioxidants on sperm survival and functionality is well-known. As well as the manipulation biotechnics and the process of sperm cryopreservation.

**Keywords:** EROs; Sperm motility; Cytometry; CASA.

## Lista de Figuras

Figura 1- Estrutura do espermatozoide.....	21
Figura 2- Principais EROs e enzimas antioxidantes no ambiente celular.....	26
Figura 3- Estrutura química do composto Quercetina.. ..	37
Figura 4- Estrutura química do composto Kaempferol.. ..	38
Figura 5- Representação esquemática das análises de velocidade expressas pelo sistema casa em uma trajetória irregular.. ..	41
Figura 6- Desenho esquemático das análises sobre a motilidade espermática.. ..	51
Figura 7- Desenho esquemático das análises espermáticas com sondas fluorescentes.....	51
Figura 8- Efeito da adição de Quercetina sobre o potencial de membrana mitocondrial com indução de estresse oxidativo em sêmen congelado bovino.....	59
Figura 9- Efeito da adição de Kaempferol sobre o potencial de membrana mitocondrial com indução de estresse oxidativo em sêmen congelado bovino.....	59
Figura 10- Efeito da adição de Quercetina sobre o estresse oxidativo intracelular com indução de estresse oxidativo em sêmen congelado bovino .....	60
Figura 11- Efeito da adição de Quercetina sobre a integridade de membrana plasmática e acrossomal em espermatozoides com indução de estresse oxidativo.....	62
Figura 12- Efeito da adição de Kaempferol sobre a integridade de membrana plasmática e acrossomal em espermatozoides com indução de estresse oxidativo.....	63

## Lista de Tabelas

Tabela 1 Avaliações espermáticas pelo Sistema Computer Assisted Sperm Analysis do tratamento com a molécula Quercetina nas crescentes concentrações (0,01 - 1 µg/ml).....	56
Tabela 2 Avaliações espermáticas pelo Sistema Computer Assisted Sperm Analysis do tratamento com a molécula Kaempferol nas crescentes concentrações (0,01 - 1 µg/ml).....	57

## Lista de Abreviaturas e Siglas

PIV	Produção <i>in vitro</i> de embriões
EROs	Espécies reativas de oxigênio
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ATP	Trifosfato de adenosina
ADP	Adenosina difosfato
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
FMN	Flavina mononucleotídeo
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superóxido
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
OH <sup>-</sup>	Hidroxil
O <sub>2</sub>	Oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
CAT	Catalase
GPx	Glutathione peroxidase
Fe <sup>2+</sup>	Íon Ferroso
Cu <sup>2+</sup>	Íon Cuproso
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
RNA	Ácido ribonucleico
H <sup>+</sup>	Cátion hidrogênio
CASA	Computer Assisted Sperm Analysis
LIN	Linearidade
STR	Retilinearidade
VCL	Velocidade curvilínea
VSL	Velocidade em linha reta
VAP	Velocidade média do percurso
BCF	Frequência de batimento flagelar cruzado

ALH	Amplitude do deslocamento lateral da cabeça
PI	Iodeto de propídeo
PSA	Aglutinina de <i>Pisum sativum</i>
FITC	Isoticionato de fluoresceína
nm	Nanômetro
mV	Milivolt
mL	Mililitros
G	Constante gravitacional
°C	Celsius
nM	Nanomolar
sptz	Espermatozoide
μL	Microlitro
μg	Micrograma
μM	Micromolar
mg	Miligrama
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
mW	Miliwatt
CRG	CellRox® Green
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ABIEC	Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
BHA	Butil hidroxianisol
BHT	Butil hidroxitolueno
TBHHQ	Butil hidroxiquinona
MPI + AR	Membrana plasmática íntegra + acrossomo reacionado
MPL + AR	Membrana plasmática lesada + acrossomo reacionado

MPL + AI      Membrana plasmática lesada + acrossomo íntegro

MPI + AI      Membrana plasmática íntegra + acrossomo íntegro

## Lista de Símbolos

$\pm$	Mais ou menos
$<$	Menor
$=$	Igual

## Sumário

1.	Introdução.....	17
2.	Objetivos.....	20
2.1.	Objetivo Geral.....	20
2.2.	Objetivos Específicos.....	20
3.	Revisão de Literatura.....	21
3.1.	Características estruturais e funcionais do espermatozoide.....	21
3.2.	Geração de EROs no sêmen.....	23
3.2.1.	EROs e a capacitação espermática.....	27
3.3.	Danos causados nos espermatozoides pelas EROs .....	28
3.3.1.	EROs e seu efeito nas mitocôndrias espermáticas .....	29
3.3.2.	EROs e seu efeito na membrana plasmática espermática .....	30
3.3.3.	EROs e seu efeito na molécula de DNA .....	31
3.4.	Mecanismos espermáticos de defesa antioxidante .....	32
3.5.	Compostos fenólicos como antioxidantes.....	35
3.5.1.	Quercetina .....	37
3.5.2.	Kaempferol .....	38
3.6.	Avaliações espermáticas .....	38
3.6.1.	Avaliação da cinética espermática.....	39
3.6.2.	Avaliação morfofuncional por sondas fluorescentes.....	42
3.6.2.1.	Avaliação da membrana plasmática .....	43
3.6.2.2.	Avaliação da membrana acrossomal.....	44
3.6.2.3.	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial.....	45
3.6.2.4.	Avaliação da estrutura da cromatina espermática .....	47
4.	Metodologia .....	49
4.1.	Reagentes e soluções .....	49
4.2.	Processamento das amostras seminais .....	49
4.3.	Indução de estresse oxidativo .....	49
4.4.	Efeito dos compostos fenólicos sobre a função espermática .....	50
4.5.	Avaliações de funções espermáticas.....	51

4.5.1.	Análise de motilidade espermática computadorizada .....	51
4.5.2.	Avaliação espermática com sondas fluorescentes .....	52
4.5.2.1.	Ensaio de potencial de membrana mitocondrial .....	52
4.5.2.2.	Ensaio de estresse oxidativo total .....	53
4.5.2.3.	Ensaio da integridade da membrana plasmática e acrossomal .....	54
4.6.	Análise estatística .....	54
5.	Resultados e discussão .....	55
5.1.	Efeito sobre a motilidade espermática .....	55
5.2.	Efeito sobre potencial de membrana mitocondrial .....	58
5.3.	Estresse oxidativo total interno .....	60
5.4.	Avaliação da integridade da membrana plasmática e do acrossoma .....	61
6.	Conclusão .....	66
	Referências Bibliográficas .....	67

## 1. INTRODUÇÃO

Estima-se que o rebanho bovino no Brasil, segundo o IBGE de 2014 esteja em torno de 212,3 milhões de cabeças. O país ocupa o segundo maior rebanho no ranking mundial, estando somente atrás da Índia. As exportações de carne bovina brasileira atingiram, em julho de 2016, um faturamento de US\$ 423 milhões, com o embarque de 109,4 mil toneladas, segundo dados divulgados pela Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC).

Com o constante aumento do rebanho bovino no Brasil, o melhoramento genético tem sido um importante foco de estudo como estratégia para maximizar a eficiência produtiva dos rebanhos. Neste sentido, torna-se indispensável a utilização e o desenvolvimento de biotecnologias que permitam o aumento da eficiência reprodutiva. Desta maneira, fica demonstrado a grande importância de estudos na área visando o melhoramento das técnicas reprodutivas (SILVEIRA et al., 2004; MILAZZOTTO et al., 2008; LÔBO et al., 2010; EUCLIDES FILHO, 2015).

Dentro desse contexto, as técnicas reprodutivas na área da bovinocultura têm sido amplamente difundidas com vistas ao maior aproveitamento da produção de descendentes e melhoramento genético. Sendo assim, a produção *in vitro* de embriões (PIV) no Brasil, é uma importante técnica de reprodução assistida aplicável a mamíferos domésticos de interesse econômico, a qual busca aumentar a produção em um menor intervalo de tempo e também gerar melhoramento genético das descendentes, otimizando o potencial reprodutivo dos animais (DE CASTRO, 2016a). A PIV tem ocupado lugar de destaque em função do potencial que oferece para acelerar a melhoria genética dos rebanhos (HASLER, 1992).

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2014), o Brasil é o maior produtor mundial de embriões bovinos *in vitro*, com uma produção anual em torno 320 mil embriões, o que representa cerca de 50% do mercado mundial. O país já exporta esse tipo de produto

para Botswana, Costa Rica, Etiópia e Moçambique e, a partir de 2016, o Brasil passará a vender embriões bovinos produzidos *in vitro* para o Paraguai (MAPA, 2016).

Os programas de melhoramento genético podem ser otimizados pelo uso da genômica e da biologia molecular, onde tem-se a identificação e seleção de características de difícil mensuração e de interesse de criadores em reprodutores selecionados, viabilizando a avaliação genética. Neste cenário, a transferência de conhecimentos e tecnologias gerados pela genômica aplicada é de fundamental importância, pois os avanços em melhoramento genético animal só ocorrerão se esses resultados forem incorporados aos sistemas de produção (EMBRAPA, 2016).

O sêmen de boa qualidade é um dos fatores determinantes para a fecundação e desenvolvimento embrionário tanto *in vivo* como em *in vitro*. Por isso, seu processamento deve preservá-lo ao máximo, pois a qualidade espermática pode ser comprometida devido às injúrias ou defeitos estruturais e funcionais (ZHANG et al., 1999).

Sabe-se que a criopreservação de espermatozoides é uma biotecnologia muito utilizada e de extrema importância para programas de reprodução animal, pois viabiliza a utilização de reprodutores de localidades distantes gerando ganho genético pela possibilidade de se usar bons touros reprodutores sem precisar desalocá-los, uma vez que o sêmen estocado a -196°C (temperatura do nitrogênio líquido) permanece viável para posterior uso por tempo indefinido (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Na maioria dos laboratórios de técnicas reprodutivas, na PIV, são utilizadas palhetas de sêmen congelado. Entretanto, diversos autores já relataram que os processos de congelamento e descongelamento causam diminuição do número de espermatozoides viáveis por dose (AMANN; PICKET, 1987; WATSON, 2000).

Estudos demonstram que os principais danos causados pelo decréscimo da temperatura são alterações nos padrões de motilidade (RUIZ-PESINI et al., 1998; DE CASTRO et al., 2016a), integridade de membranas acrossomais e plasmática (HAMILTON et al., 2016), no DNA espermático (AITKEN; DE IULIIS, 2010; DE CASTRO et al., 2016b) e em mitocôndrias, o

que pode acarretar na liberação desordenada e exacerbada de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais são potencialmente nocivas aos espermatozoides, que, por sua vez são potencialmente susceptíveis a danos celulares por estresse oxidativo (OLLERO et al., 1998; DE CASTRO et al., 2016b; HAMILTON et al., 2016).

Tendo em vista a problemática no que tange a relação do estresse oxidativo em detrimento à qualidade espermática em bovinos, grande atenção deve ser dada aos sistemas exógenos de defesa antioxidantes, e às novas perspectivas em termos de terapias antioxidantes utilizadas na criopreservação do sêmen, a fim de garantir uma maior viabilidade e diminuição do estresse oxidativo. Nessa linha hipotiza-se que antioxidantes exógenos podem reduzir a concentração exacerbada de espécies reativas de oxigênio, melhorando a qualidade do sêmen criopreservado por meio da prevenção ou redução do processo oxidativo, bem como causando melhora nas funções espermáticas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Este trabalho teve como objetivo avaliar, em sêmen bovino congelado, o efeito dos compostos fenólicos Quercetina e Kaempferol sobre a função espermática, em condições de estresse oxidativo induzido.

### **2.2. Objetivos Específicos**

Determinar o efeito dos compostos fenólicos Quercetina e Kaempferol sobre os parâmetros de motilidade espermática em espermatozoides de bovinos;

Avaliar o efeito dos compostos fenólicos Quercetina e Kaempferol sobre o potencial mitocondrial, integridade de membrana plasmática e acrossomal em espermatozoides de bovinos.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Características estruturais e funcionais do espermatozoide

A estrutura do espermatozoide é recoberta por membrana plasmática e é formada por cabeça, contendo o núcleo e cauda, conforme ilustrado na Figura 1. É importante ressaltar que a estrutura e a dimensão dessa célula variam de acordo com a espécie, mas todas têm a função de deslocar o espermatozoide até o encontro do oócito e assegurar a liberação do material genético para formação de um embrião (GARNER; HAFEZ, 2004).

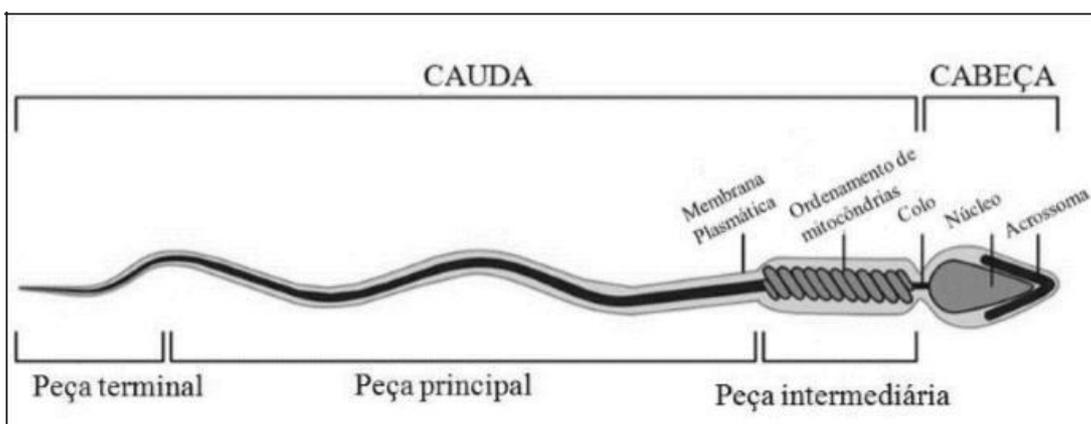


Figura 1- Estrutura do espermatozoide. Adaptado de SERIDA (2005).

A cabeça do espermatozoide bovino tem característica de possuir forma arredondada e achatada e é composta por núcleo e acrossoma. O núcleo é formado por uma massa de DNA condensada, denominada de cromatina, a qual está envolta por um envelope nuclear, e estabilizada por um complexo de proteínas denominadas de protaminas (GARNER; HAFEZ, 2004).

O acrossoma localiza-se na extremidade anterior da cabeça do espermatozoide sob o núcleo espermático, e está envolto por uma dupla camada de membrana acrossomal, a qual está repleta de enzimas hidrolíticas, incluindo pró-acrosina, hialuronidase, esterases e hidrolases ácidas, as quais estão envolvidas no processo de fecundação (MANN;

LUTWAK-MANN, 1981) por serem liberadas após a fusão da membrana acrossomal com a membrana plasmática durante a fecundação, permitindo a passagem do espermatozoide pela zona pelúcida do oócito (GARNER; HAFEZ, 2004) e a dispersão das células do *cumulus oophorus* (HAFEZ, 1995).

Durante a reação do acrossomo, a membrana externa acrossomal funde-se com o plasmalema, sob o controle intra e extra-celular do cálcio, determinando a exocitose de todo conteúdo do acrossomo (HARRISON; ROLDAN, 1990). A membrana interna do acrossomo é relativamente estável e permanece intacta após a reação do acrossomo ter ocorrido. A penetração da zona pelúcida e fusão com o oolema são eventos mediados por receptores, com áreas específicas da cabeça do espermatozoide se aderindo aos alvos no ovócito (HAFEZ, 1995).

Segundo Garner e Hafez (2004), a cauda, ou flagelo espermático, é composta pelo colo, peça principal, intermediária e terminal, sendo esta estrutura que confere motilidade ao espermatozoide. O colo é a estrutura conectiva entre a cabeça e a peça intermediária da cauda. A região da cauda entre o colo e o annulus é a peça intermediária. A parte central da peça intermediária junto com o comprimento total da cauda forma o axonema, o qual é responsável pelo movimento da cauda, e é composto por nove pares de microtúbulos dispostos radialmente ao redor de dois filamentos centrais, e recoberto por uma camada fibrosa que promove estabilidade aos elementos contráteis da cauda. A peça intermediária, localizada posteriormente ao colo, contém mitocôndrias em forma de hélice, as quais possuem a função de gerar energia para a movimentação espermática (MANELLA, 2000).

Já as membranas espermáticas, como a plasmática, acrossomal e nuclear são compostas por uma bicamada lipídica, proteínas, glicoproteínas e glicolípídeos e exercem papel fundamental na fisiologia do espermatozoide, portanto a integridade dessas estruturas é essencial para o processo efetivo de fecundação (CELEGHINI et al., 2007). Em condições de estresse, como por exemplo, na criopreservação, essa estrutura pode sofrer rearranjos estruturais formando pontos vulneráveis e, com isso, induzir uma excessiva

permeabilização ou o rompimento da mesma. Suas funções estão relacionadas com o metabolismo celular – manutenção do equilíbrio osmótico entre o meioextra e intracelular-, capacitação espermática, reação acrossomal e interação do espermatozoide com o oócito (PEÑA et al., 2007).

### **3.2. Geração de EROs no sêmen**

Apesar de o oxigênio possuir papel fundamental para a produção de energia nos organismos aeróbicos, ele pode ter efeito deletério devido a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), esse efeito prejudicial foi sugerido por Halliwell e Gutteridge (1999). Todos os organismos aeróbicos necessitam de oxigênio molecular como receptor eletrônico para uma produção eficiente de energia. Portanto, o oxigênio na célula aeróbica, participa da principal via de produção de energia, a fosforilação oxidativa. Essa via metabólica fosforila a adenosina difosfato (ADP) em trifosfato de adenosina (ATP), utilizando elétrons liberados nas reações de oxi-redução na mitocôndria. É importante ressaltar que os principais carreadores de elétrons são a nicotinamida adenina dinucleotídeo ( $\text{NAD}^+$ ) e as flavinas (flavina mononucleotídeo – FMN e a flavina adenina dinucleotídeo - FAD). As formas reduzidas ( $\text{NADPH}$ ,  $\text{FMNH}_2$  e  $\text{FADH}_2$ ) acabam por ser oxidadas pelo oxigênio, produzindo o ATP. Sendo assim, a oxidação ocorre liberando energia gradativamente em um processo denominado cadeia transportadora de elétrons (NELSON; LEHNINGER; COX, 2008).

Os fosfolipídios parecem ser a fonte principal de substrato para respiração endógena dos espermatozoides (SCOTT, 1973). Segundo Scott (1973) os tipos de fosfolipídios presentes nos espermatozoides variam consideravelmente de uma espécie para outra, sendo que plasmalogencolina é o principal fosfoglicerídio dos espermatozoides dos ruminantes domésticos. Esses fosfoglicerídios são hidrolizados e há liberação de ácidos graxos, que são oxidados rapidamente, promovendo, desta maneira, energia celular (MILLS; SCOTT, 1969). Porém, como o oxigênio é um forte oxidante, torna-se impossível impedir oxidações secundárias promovidas por esta molécula, as

quais por não estarem envolvidas efetivamente no metabolismo fisiológico, podem trazer conseqüências graves se os seus produtos não forem neutralizados por um sistema antioxidante eficiente (SORG, 2004).

Segundo Araújo (2001), a oxidação de lipídios é um exemplo típico de reação envolvendo radicais livres. O organismo produz naturalmente radicais livres e outras espécies reativas oriundas do oxigênio pelo próprio metabolismo, como subprodutos da respiração e da síntese de estruturas mais complexas. Desta maneira, os ácidos graxos insaturados podem ser atacados quimicamente pelos radicais livres, fazendo com que ocorram reações propagadoras de auto-oxidação, resultando na formação de novos radicais livres (BOOTH; MCDOWELL, 1992; ARAÚJO, 2001).

Quimicamente, o termo radical livre refere-se a um átomo ou molécula altamente reativa, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, podendo assim ser definido como qualquer espécie com elétron desemparelhado no orbital (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984). E é justamente esta falta de emparelhamento de elétrons da última camada, que confere alta reatividade e instabilidade a esses átomos ou moléculas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Sabe-se que baixas concentrações de radicais livres são importantes para os processos bioquímicos normais, como: na sinalização e no controle do crescimento celular; no ataque de patógenos invasores; na síntese enzimática de processos bioativos pelas ciclooxygenases, lipoxigenases e pelo nucleotídeo redutase (formação de deoxirribonucleotídeos a partir de ribonucleotídeo); e na detoxificação de substâncias estranhas. Entretanto, quando sua produção ocorre em quantidade superior à capacidade de neutralização pelas células, distúrbios celulares e metabólicos podem ocorrer de diversas maneiras (BORGES, 2003).

Dentro do grande grupo de radicais livres, tem-se que os mais importantes para as células aeróbicas são os derivados do oxigênio, os quais fazem parte do grupo das EROs. As EROs mais comumente geradas pelos espermatozoides são o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e o radical hidroxil (OH<sup>-</sup>), produzidas em reações em cadeia (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1993).

Segundo Nordberg e Arnér (2001) o ânion superóxido é produzido enzimaticamente de forma espontânea, especialmente na membrana mitocondrial através da cadeia respiratória, pela redução do oxigênio (O<sub>2</sub>) pela enzima NADPH oxidase ou xantina oxidase, e é a primeira espécie reativa formada na cadeia transportadora de elétrons, devido ao escape de elétrons. É um radical pouco reativo e não tem habilidade de penetrar nas membranas lipídicas, agindo apenas no compartimento onde é produzido. A enzima superóxido dismutase (SOD) é responsável por dismutar esse radical formando peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), o qual não é considerado um radical livre, mas é classificado como uma ERO, podendo causar danos e passar com facilidade pelas membranas biológicas, pois participa como intermediário na reação de Fenton, que produz o radical hidroxil (OH<sup>-</sup>) (NORDBERG; ARNÉR, 2001). A decomposição do peróxido ocorre pela ação da catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). A conversão da glutathione oxidada (GSSG) novamente à glutathione reduzida (GSH) ocorre pela ação da glutathione reductase (GR) (NORDBERG; ARNÉR, 2001), conforme mostra a Figura 2.

Sendo considerado o radical que mais confere efeito deletério aos sistemas biológicos, o radical hidroxil pode ser formado pela reação de Fenton, na qual o peróxido de hidrogênio pode reagir com os íons metálicos Fe<sup>2+</sup> ou Cu<sup>2+</sup> (Figura 2). Mesmo não tendo capacidade para atravessar as barreiras das membranas, pode reagir com biomoléculas próximas, podendo ser lesivo ao DNA (revisado por HALLIWELL, 2001) e desencadeando a peroxidação dos lipídeos nas membranas celulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

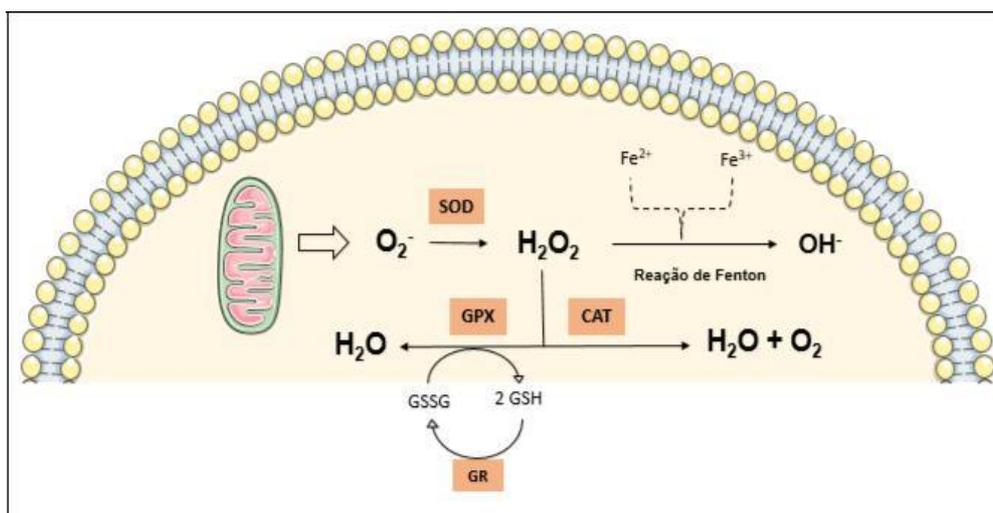


Figura 2 - Principais EROs e enzimas antioxidantes no ambiente celular. Fonte: O Autor.

As EROs exercem um duplo papel na fertilidade do macho. Por um lado, elas são fundamentais em processos como hiperativação da motilidade, capacitação, reação acrossômica e fertilização. Por outro lado, elas também podem causar severos danos aos espermatozoides, quando os seus mecanismos de defesa estão limitados (MAIA; BICUDO, 2009). Portanto, uma produção controlada de EROs é de fundamental importância para a sua função espermática normal. Enquanto que, a superprodução e/ou defesas antioxidantes inadequadas levam a estresse oxidativo, resultando em impacto negativo na fertilidade (AITKEN, 1995)

Durante o processamento do sêmen destinado à criopreservação, o desequilíbrio entre a geração de EROs e a atividade antioxidante pode ser desencadeado, tanto pelo comprometimento da capacidade protetora dos antioxidantes presentes no ejaculado, a partir da marcante redução de suas concentrações após diluição do sêmen, quanto pelo estímulo à produção de EROs, durante a criopreservação (WATSON, 2000).

A possível causa destas alterações fisiológicas nos espermatozoides pode estar relacionada à exposição desses ao sistema *in vitro*, o qual, por ser um ambiente desfavorável, pode propiciar alta produção de radicais livres, como as EROs, as quais são altamente prejudiciais à célula se em altas concentrações. A ausência de mecanismos de defesa endógenos, a exposição dos gametas às sucessivas manipulações e a criação de ambiente

propício para a geração de estresse oxidativo são fatores importantes para o acúmulo de EROs *in vitro*. Também pelo fato de, na FIV, os espermatozoides serem submetidos à separação por centrifugações sucessivas para remoção do diluidor, de crioprotetores e de células mortas, fazendo com que o gameta perca sua proteção antioxidante proveniente dos diluentes e do plasma seminal (DE CASTRO, 2016a).

### **3.2.1. EROs e a capacitação espermática**

A capacitação espermática é necessária para que ocorra a fertilização, sendo resultante de alterações na membrana plasmática, as quais tornam os espermatozoides capazes de efetuar a reação acrossômica verdadeira. Em condições fisiológicas, a capacitação ocorre durante exposição a uma glicoproteína que compõe a zona pelúcida do oócito (BLEIL; WASSARMAN, 1983). O processo, portanto, é caracterizado pelo influxo de cálcio, aumento da fluidez da membrana, aumento do pH intracelular e AMP cíclico, fosforilação de proteínas, bem como hiperativação da motilidade (SIGNORELLI; DIAZ; MORALES, 2012).

A capacitação espermática termina com o evento de exocitose chamado de reação acrossômica, a qual tem como objetivo permitir que os espermatozoides penetrem na zona pelúcida do oócito (YANAGIMACHI, 1994; O'FLAHERTY et al., 2006). A reação acrossomal envolve múltiplas funções entre a membrana acrossomal externa e a membrana plasmática, possibilitando que o conteúdo do acrossomo seja liberado através de canais de membrana (THÉRIEN et al., 1995). Os locais onde estas fusões se iniciam são aqueles onde a membrana acrossomal externa é menos estável e onde há maior quantidade de sítios de ligação com o cálcio (YANAGIMACHI, 1994).

O envolvimento das EROs no processo de capacitação espermática *in vitro*, depende das condições de incubação (tampões, meios e indutores), bem como o tempo de exposição da célula, sendo os efeitos espécie-específicos (DE LAMIRANDE et al., 1997).

A criopreservação do sêmen, assim como as sucessivas lavagens podem antecipar o processo de capacitação pela alteração de permeabilidade de membrana e remoção de agentes decapitantes (CORMIER; SIRARD; BAILEY, 1997; LEAHY; GADELLA, 2011). Conseqüentemente, a reação acrossômica em espermatozoides provenientes de sêmen congelado pode ser realizada em menor tempo do que o necessário para sua indução em relação a amostras de sêmen *in natura* no trato genital da fêmea (O'FLAHERTY et al., 1999; WATSON, 2000).

Em bovinos, para que ocorram os fenômenos de capacitação espermática, hiperativação da motilidade, reação acrossômica e fusão dos gametas, existem evidências de que pequenas quantidades do ânion superóxido e de peróxido de hidrogênio são necessárias (O'FLAHERTY et al., 2003).

Visando avaliar o envolvimento das EROs na capacitação espermática em bovinos, O'Flaherty et al. (2003) incubaram espermatozoides na presença de heparina (indutor da capacitação espermática) e de várias concentrações de catalase e, em seguida, determinaram a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o percentual de espermatozoides capacitados. Sendo assim, inferiram que o ânion superóxido é a EROs envolvida nos mecanismos celulares que levam à capacitação do espermatozoide bovino, porém a via e as enzimas que atuam neste processo ainda não foram bem esclarecidas (O'FLAHERTY; DE LAMIRANDE; GAGNON, 2006).

### **3.3. Danos causados nos espermatozoides pelas EROs**

O efeito das EROs já foi elucidado por diversos pesquisadores, onde afetam negativamente a qualidade do sêmen, incluindo perda da motilidade de forma irreversível (RUIZ-PESINI et al., 1998), lesões ao DNA espermático e mitocondrial (AITKEN; DE IULIIS, 2010) e perda de enzimas intracelulares (VALENÇA; GUERRA, 2004), interferindo na capacidade fecundante do espermatozoide, bem como na integridade de membranas (DU PLESSIS et al., 2010). Neste sentido, Jones e Mann (1977), já haviam relatado que:

“A oxidação espermática é acompanhada por alterações estruturais na região acrossômica, diminuição da motilidade e perda de constituintes intracelulares”.

### **3.3.1. EROs e seu efeito nas mitocôndrias espermáticas**

As mitocôndrias são as estruturas subcelulares dos espermatozoides mais sensíveis ao resfriamento e ao congelamento (PEÑA et al., 2009). Exclusivamente localizadas na peça intermediária, as mitocôndrias são responsáveis pela produção da energia necessária para a motilidade espermática (GRAVANCE et al., 2000), essa energia é armazenada na forma de ATP, o qual é quebrado por enzimas (ATPases), resultando na liberação da energia necessária para a movimentação da cauda (BARTH; OKO, 1989). De acordo com essa evidência, parece lógico que se foque o interesse em antioxidantes com capacidade de facilmente alcançar as mitocôndrias (SILVA et al., 2011).

Sabe-se que nos espermatozoides, a geração de EROs está relacionada com a cadeia transportadora de elétrons e pode ocorrer pela enzima NADPH oxidase (KOPPERS et al., 2008). Portanto, a produção de espécies reativas de oxigênio nas mitocôndrias ocorre pelo escape de elétrons para o oxigênio, produzindo o ânion superóxido. Normalmente, na célula essa taxa de vazamento mantém-se baixa e controlada, tendo em vista que a concentração de oxigênio dentro da mitocôndria é baixa. A passagem dos elétrons para o próximo complexo é facilitada pelo arranjo dos complexos carreadores de elétrons e a presença de proteínas desacopladoras nas mitocôndrias, ao invés deste escapar para o oxigênio. Porém, quando há alterações na organização da mitocôndria, seja pelo bloqueio de algum complexo ou mesmo na integridade da membrana desta organela celular, o vazamento e posterior formação de superóxido são facilitados. Uma vez formado, este ânion torna-se altamente lesivo à célula, podendo oxidar

lipídeos, proteínas e até mesmo DNA (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; NORDBERG; ARNÉR, 2001).

Ferramosca et al. (2013) demonstraram em seus estudos que a respiração mitocondrial é afetada negativamente pelo estresse oxidativo, por meio do desacoplamento entre o transporte de elétrons e a síntese de ATP. Nesse caso, a diminuição da eficiência de respiração mitocondrial pode ser uma das possíveis causas de decréscimo de motilidade frente à alta concentração de EROs. Outro fator que pode induzir dano peroxidativo na peça intermediária é a inibição da fosforilação oxidativa, podendo contribuir para a perda de motilidade total e progressiva do espermatozoide (KOPPERS et al., 2008).

### **3.3.2. EROs e seu efeito na membrana plasmática espermática**

A membrana dos espermatozoides é uma estrutura complexa, com diferentes domínios caracterizados por proteínas de adesão e fusão da membrana espermática com a membrana plasmática do oócito. Ela é rica em ácidos graxos poli-insaturados que, por conta da sua conformação, contribuem para maior fluidez de membrana da célula. Porém, esse fato torna o espermatozoide altamente susceptível ao ataque das EROs, desencadeando o processo de peroxidação lipídica (FLESCH; GADELLA, 2000).

A integridade da membrana plasmática garante a manutenção da homeostase celular, atuando como barreira entre os meios interno e externo (AMMAN; PICKET, 1987). Em condições de estresse provocado pela criopreservação, as membranas podem sofrer rearranjos, formando pontos vulneráveis e, com isso, induzir a excessiva permeabilidade ou mesmo rompimento da membrana (AMANN; GRAHAM, 1993). A membrana plasmática, é portanto, a estrutura do espermatozoide mais susceptível a modificações durante o processo de criopreservação, e sua integridade é fundamental para que os espermatozoides estejam viáveis no momento da fecundação (BORGES et al., 2011).

Espermatozoides são particularmente susceptíveis a danos celulares por estresse oxidativo devido à pequena quantidade de citoplasma na célula espermática normal, o que limita a quantidade de antioxidantes, principalmente os enzimáticos (VERNET; AITKEN; DREVET, 2004).

Quando reagem com os lipídeos da membrana, as EROs promovem a formação de radicais com potencial para produzir a peroxidação do ácido graxo adjacente. Essa reação é altamente deletéria, acarretando na diminuição da fluidez de membrana e posterior redução da capacidade fecundante do espermatozoide (AITKEN; CLARKSON; FISHEL, 1989; ZABLUDOVSKY et al., 1999).

Para mamíferos domésticos, a peroxidação lipídica está diretamente relacionada ao processo de resfriamento e criopreservação do espermatozoide (PARTYKA; LUKASZEWICZ; NIZANSKI, 2012; GÓMEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013). A oxidação de lipídios é um exemplo típico de reação envolvendo espécies reativas de oxigênio (ARAÚJO, 2001). Ainda, de acordo com Araújo (2001), a velocidade de reação de oxidação depende do grau de insaturação na molécula do ácido graxo, assim, quanto maior o grau de insaturação, maior será a suscetibilidade à oxidação. Desta maneira, os ácidos graxos insaturados podem ser atacados quimicamente pelo radical livre, fazendo com que ocorra reação propagadora de auto-oxidação, na formação de novos radicais livres (BOOTH; MCDOWELL, 1992; ARAÚJO, 2001).

Apesar do potencial de membrana mitocondrial e da integridade das membranas plasmáticas e acrossomal estarem diretamente relacionadas ao processo de fecundação, vários autores não tiveram êxito em correlacionar estes atributos espermáticos com a fertilidade *in vitro* (HOLT; O'BRIEN; ABAIGAR, 2007) e *in vivo* (AL NAIB et al., 2011) de touros.

### **3.3.3. EROs e seu efeito na molécula de DNA**

O DNA dos espermatozoides de mamíferos é considerado o DNA mais compactado das células eucariotas (WARD; COFFEY, 1991). As protaminas,

as quais são proteínas nucleares, são responsáveis por este alto grau de compactação (ZINI; AGARWAL, 2011), substituindo as histonas a partir do processo de espermatogênese.

De Castro et al. (2016a) demonstraram que os espermatozoides bovinos, quando expostos a um ambiente oxidativo, têm prejuízo no que diz respeito ao DNA, com impacto sobre o desenvolvimento do embrião. O ataque das EROs nos espermatozoides pode causar ligação entre as bases constituintes do DNA, desestabilizando a molécula na geração de quebra de fita dupla de DNA (AITKEN; DE IULIIS, 2010). Vale ressaltar que o dano de DNA está mais relacionado com a produção de EROs geradas pela criopreservação do que apoptose celular (THOMSON et al., 2009).

O radical hidroxila desempenha importante papel no que tange ao dano à cromatina, podendo alterar a estrutura de bases nitrogenadas em moléculas de DNA e RNA, iniciando um processo de oxidação em cadeia e, assim, gerando componentes oxidantes. Em outras palavras, lesões oxidativas podem ser um biomarcador preditivo para dano oxidativo no DNA, pela formação de moléculas específicas após ligação com o radical hidroxila, como por exemplo a formação de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosine (8OHdG). Estudos em humanos demonstraram que a presença de 8OHdG na célula espermática tem alta correlação com a fragmentação de DNA (DE IULIIS et al., 2009). No caso de células com replicação de DNA ativo, essas alterações estruturais na molécula de DNA são reparadas, impedindo a perpetuação do dano gerado pelas EROs. Porém, como a célula espermática madura é uma célula com replicação inativa, não é capaz de reparar esse tipo de lesão (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

### **3.4. Mecanismos espermáticos de defesa antioxidante**

Sabe-se que espermatozoides possuem um sistema redox complexo, devido ao potencial antioxidante do plasma seminal e ao potencial oxidativo dos metabólitos espermáticos (STRADAIOLI et al., 2007). Dessa maneira, as células espermáticas podem ter estresse oxidativo adicional, tornando

necessária uma proteção exógena (TAYLOR, 2001), por possuírem poucos mecanismos capazes de evitar parcialmente a produção de espécies reativas de oxigênio e prevenir a peroxidação excessiva dos substratos (SILVA, 2006). Portanto, é nesse momento que os mecanismos de defesa antioxidante endógenos ou exógenos são requeridos para suprir e regular os danos que as EROs, em excesso, podem conferir às células em geral.

De acordo com Halliwell e Gutteridge (2012), antioxidante pode ser definido como qualquer substância, que estando presente em baixas quantidades, quando comparada com substratos oxidáveis, atrasa ou inibe significativamente a oxidação desse substrato. São características desejáveis às moléculas antioxidantes: apresentarem menor energia de ativação que as moléculas oxidáveis, baixa capacidade de perder ou ganhar elétrons e de reagir com o oxigênio, possuir atividade antioxidante mesmo em pequenas quantidades e serem recicladas direta ou indiretamente por sistemas enzimáticos (BUETTNER, 1993).

A maioria das espécies vivas possui eficiente sistema de proteção capaz de neutralizar os efeitos maléficos ocasionados pelas espécies reativas formadas durante o metabolismo do oxigênio e da oxidação de lipídios. Segundo Nordberg e Arnér (2001), o sistema antioxidante celular pode ser dividido em sistemas enzimáticos e não enzimáticos. O sistema enzimático de proteção das membranas celulares contra a peroxidação lipídica é composto basicamente por três enzimas: a glutathione peroxidase (GPx), a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) (AITKEN et al., 1996; BRIGELIUS-FLOHÉ, 1999). Já o sistema de proteção de membranas não enzimático é composto basicamente pelas vitaminas E ( $\alpha$ -tocoferol) e C (ascorbato), as quais são capazes de reduzir os radicais oxidantes à níveis fisiológicos e, assim, impedir a cascata oxidativa (BUETTNER, 1993), além de vitamina A, piruvato, glutathione, taurina e hipotaurina (AGARWALL; ALLAMENI, 2004).

Essas enzimas antioxidantes estão presentes no plasma seminal e nos espermatozoides dos animais. Na espécie bovina, as enzimas GPx, SOD e CAT (em baixa concentração) foram encontradas no plasma seminal, enquanto que, nos espermatozoides foram encontrados principalmente

superóxido dismutase e baixa concentração de glutathione peroxidase. Verificou-se ausência da catalase nos espermatozoides bovinos, diferindo de outras espécies, como a humana e a ovina, nas quais foi detectada a atividade da mesma (BILODEAU et al., 2002). A catalase presente no plasma seminal esteja relacionada, em ovinos e bovinos, ao controle do estresse oxidativo nas células (BUCAK et al., 2007).

Segundo Aitken (1995), a atividade biossintética do espermatozoide é limitada, tornando difícil a substituição de moléculas que tenham sido danificadas. Além disso, as enzimas antioxidantes podem estar concentradas na peça intermediária, deixando grande parte da membrana que cobre a cabeça e a cauda menos protegida. Por isso, o plasma seminal é particularmente importante na proteção do espermatozoide contra os danos causados pelos EROs gerados pelo próprio espermatozoide e pelos fagócitos presentes no ejaculado. Porém, sabe-se que a lavagem retira a proteção antioxidante fornecida pelo plasma seminal, podendo contribuir para aumentar os danos oxidativos ao espermatozoide, quando se observa o sêmen manipulado (DE CASTRO et al., 2016a). Dessa forma, a adição de antioxidantes ao sêmen, aumenta a tolerância espermática ao dano oxidativo, após descongelamento, e neutralizam os radicais livres que podem causar peroxidação lipídica na célula (BAUMBER et al., 2000).

Muitos antioxidantes artificiais têm promovido efeito benéfico contra os danos causados por EROs na motilidade e nos defeitos oxidativos (YOUSEF et al., 2003; BANSAL; BILASPURI, 2010). Eles podem ser classificados como primários e secundários (ou sinérgicos). Os primários incluem os compostos fenólicos poliidroxilados (galatos) e os fenóis com impedimento estrutural (butil hidroxianisol - BHA, butil hidroxitolueno - BHT, butil hidroxiquinona - TBHQ e tocoferóis). Estes possuem a função de inibir a fase inicial da reação pela interação com os radicais livres, ou na etapa de propagação, reagindo com os radicais alcoxil ou peroxil, e/ou pela formação do complexo antioxidante-peroxil (ARAÚJO, 2001).

Os secundários (ou sinérgicos) são classificados de forma genérica como removedores de oxigênio e complexantes, sendo o ácido ascórbico o

principal antioxidante deste grupo (ARAÚJO, 2001). Estes podem atuar na regeneração do radical fenoxil, doando hidrogênio e conseqüentemente regenerando o antioxidante primário. A habilidade dos vários antioxidantes de regenerar outras espécies oxidadas (vitamina E, vitamina C e glutathione) é, talvez, mais importante que o nível destes no organismo (BUETTNER, 1993).

### **3.5. Compostos fenólicos como antioxidantes**

Antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais (SHAHIDI et al., 1992), agindo tanto na etapa de iniciação quanto na de propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias (NAWAR, 1985). Os compostos fenólicos e alguns de seus derivados são, portanto, eficazes para prevenir a oxidação lipídica.

Os compostos fenólicos são divididos em dois grupos: flavonoides e não flavonoides (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). Os denominados flavonoides apresentam a estrutura química C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, enquanto que os não flavonoides são classificados como sendo derivados das estruturas químicas C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> (ácidos hidroxibenzoico, gálico e elágico), C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> (ácidos cafêico e p-cumárico hidroxibenzoico) e C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> (trans-resveratrol, cis-resveratrol e transresveratrol-glucosídeo) (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). Os compostos polifenólicos, em particular os flavonoides, possuem estrutura ideal para a retirada de radicais, o que decorre da presença de vários grupos hidroxila, fazendo com que eles sejam considerados antioxidantes mais potentes do que as vitaminas C e E (BARREIROS; DAVID; DAVID et al., 2006).

Deste modo, em virtude de suas propriedades de oxidorredução, os polifenóis podem desempenhar um papel importante na absorção e na neutralização das EROs, conseguindo exercer efeito quelante sobre o oxigênio tripleto e singleto ou, ainda, decompor os peróxidos formados (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004), o que por sua vez pode prevenir a ocorrência de danos espermáticos (SIKKA, 2004).

A capacidade antioxidante de compostos fenólicos é determinada por sua estrutura, em particular por hidroxilas que podem doar elétrons e suportar como resultado a deslocalização em torno do sistema aromático. Outro determinante estrutural importante é a capacidade antioxidante de flavonoides atribuídas às hidroxilas em C4 e C3, que atuam no aumento do potencial antioxidante (LIEN et al., 1999). Entretanto, a atividade antioxidante dos flavonoides depende da sua estrutura e pode ser determinada por cinco fatores: reatividade como agente doador de  $H^+$  e elétrons, estabilidade do radical flavanoil formado, reatividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição, solubilidade e interação com as membranas (BARREIROS; DAVID; DAVID et al., 2006).

Existem, no mínimo, seis possíveis diferentes mecanismos antioxidantes dos flavonoides: sequestrador direto de radicais, regulação descendente da produção de radicais, eliminação dos precursores dos radicais (peróxido de hidrogênio), quelação de metais, inibição da xantina oxidase e elevação dos antioxidantes endógenos. É importante destacar que os efeitos sequestrantes dos radicais livres não são necessariamente uma ação bioquímica única, podendo envolver mais de um tipo de reação dentro do mesmo processo oxidante (RAI, 2010).

Portanto, podem atuar como antioxidante ou pró-oxidante, dependendo do sistema testado, da concentração, do tempo de oxidação e do método usado para acompanhar a oxidação e, também, o pH dos tecidos biológicos pode influenciar a atividade dos compostos fenólicos. Sabendo-se que a estrutura, dose e via de administração influenciam no efeito biológico de cada flavonoide, pode-se ter resultados variáveis após a sua utilização, o que justifica a não proteção de algumas células e tecidos pelos compostos fenólicos, diante de todos os danos oxidativos sofridos em experimentos realizados (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

### 3.5.1. Quercetina

Quercetina é um dos muitos compostos fenólicos naturais disponíveis em plantas vasculares (ROBINSON, 1967) e foi identificado primeiramente por Szent-Gyor-gyi em 1936.

É um polifenol flavonoide (STOJANOVIC et al., 2001) que tem sido testado para o tratamento de elevadas concentrações sistêmicas de colesterol e de doenças cardiovasculares (LIMA et al., 2001), por sua capacidade adstringente (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). Este flavonoide possui efeito inibidor similar e sinérgico da peroxidação lipídica, quando comparado ao resveratrol. Matsuda e colaboradores (2004) destacaram o uso da quercetina como potencial antimicrobiano e agente anti-inflamatório para o tratamento da tripanossomíase .

Portanto, é considerado um antioxidante mais potente que as vitaminas C e E (STOJANOVIC et al., 2001), em virtude da grande quantidade de grupos hidroxila em sua estrutura (BARREIROS et al., 2006), conforme mostrado na Figura 3.

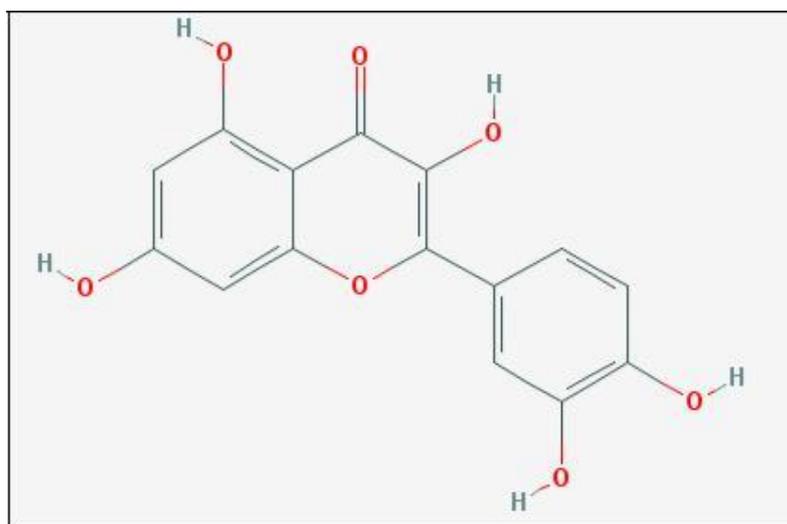


Figura 3- Estrutura química do composto Quercetina. Adaptado de PubChem Structure

Essa molécula pode inibir o processo de formação de radicais livres em três etapas diferentes: na iniciação, pela interação com íons superóxido, na

formação de radicais hidroxila, por quelar íons de ferro e na peroxidação lipídica, por reagir com radicais peroxil de lipídeos (AFANAS'EV et al., 1989).

### 3.5.2. Kaempferol

O flavonoide Kaempferol é um composto com um baixo peso molecular, o qual é comumente encontrado em alimentos derivados de plantas e em plantas utilizadas na medicina tradicional. Foi identificado em diferentes famílias botânicas e tem sido encontrado em pteridófitas, coníferas e angiospermas (CALDERON-MONTAÑO, 2011)

Segundo Calderon Montaño (2011), o Kaempferol tem se mostrado eficiente tendo uma variedade de efeitos antioxidantes *in vitro* e *in vivo*. Em baixas concentrações, age como um “limpador-super óxido”, especificamente contra os radicais hidroxila e espécies de peroxinitrito altamente reativas. Em concentrações elevadas, aumenta a atividade ou a expressão de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, a catalase, e heme oxigenase-1. A estrutura dessa molécula pode ser vista na Figura 4 abaixo.

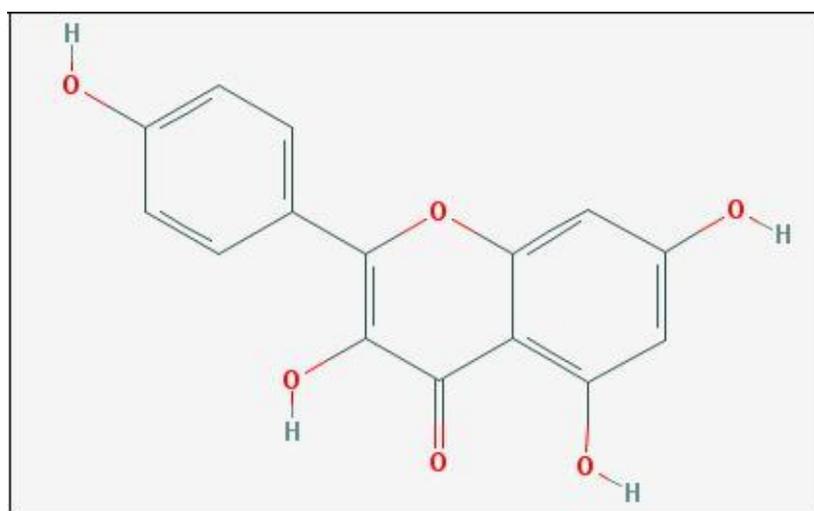


Figura 4- Estrutura química do composto Kaempferol. Adaptado de PubChem Structure.

### 3.6. Avaliações espermáticas

A observação de um único atributo espermático não permite mensurar adequadamente o potencial de fertilidade de uma amostra seminal, a qual

depende, sobretudo, da funcionalidade efetiva de diversos componentes da célula espermática (BRAUNDMEIER; MILLER, 2001). A combinação de vários parâmetros de qualidade do sêmen bovino pós-descongelamento, pode explicar de maneira mais fidedigna as possíveis diferenças de fertilidade observadas entre touros em relação a qualquer avaliação espermática tomada isoladamente (HALLAP et al., 2004).

Frente ao exposto, faz-se necessário associar diferentes avaliações laboratoriais de funções espermáticas distintas para que seja possível determinar, de maneira mais fidedigna, o grau de injúrias causado no espermatozoide após condição de estresse e também, determinar a influência dos danos sobre sua capacidade fecundante (MAZIERO et al., 2009).

### **3.6.1. Avaliação da cinética espermática**

Dentre as avaliações tradicionais da qualidade espermática, a motilidade é considerada uma das características mais importantes para prever a fertilidade do sêmen (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002). A motilidade espermática é normalmente utilizada como indicador da viabilidade celular, a qual pode ser reflexo, entre outros fatores da integridade da membrana, bem como do metabolismo intracelular (CHAN et al., 1985).

O movimento espermático representa uma das características mais importantes associadas ao potencial de fertilização de uma amostra seminal, mostrando que há uma clara associação entre a ausência de movimento espermático e os quadros de infertilidade (OLDS-CLARKE, 1996). Usada para fins de pesquisa científica, a motilidade dos espermatozoides é estimada de forma subjetiva, por meio de avaliação visual das células sob microscopia óptica convencional, representando a principal análise laboratorial utilizada pelas centrais de coleta e congelamento de sêmen (ARRUDA et al., 2005).

Nesse sentido surge o sistema computadorizado de análise espermática (Computer Assisted Sperm Analysis – CASA), sendo uma técnica de maior repetibilidade, representando um método objetivo que gera

informações importantes a respeito das propriedades cinéticas de um ejaculado baseando-se na avaliação individual das células (FERREIRA et al., 1997; JANUSKAUSKA et al., 2003), o que permite a identificação de diferentes subpopulações espermáticas em uma amostra (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002). Este detalhamento da cinética celular, proporcionada pela análise realizada pelo sistema, reflete a atividade metabólica espermática (GIL et al., 2000) e a qualidade dos espermatozoides (FARREL et al., 1996).

Mesmo com a controvérsia em relação à correlação dos padrões de movimento espermático com os índices de fertilidade *in vivo*, são observadas diferenças significativas no padrão de movimento espermático que alcançam altas e baixas taxas de fertilização (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002) Tendo isso em vista, algumas variáveis geradas pela técnica de CASA, como a linearidade espermática, mostram apresentar maior correlação com fertilidade (ZHANG et al., 1999; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2005). É importante ressaltar que a associação de múltiplas variáveis de movimento, geradas pela técnica de CASA, mostra maior correlação com fertilidade *in vivo* em relação à utilização de apenas um atributo de movimento (FARREL et al., 1998).

Alguns parâmetros que podem ser analisados com a utilização desse sistema, são por exemplo: linearidade (LIN) e retilinearidade (STR) expressos em percentual; velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL) e velocidade média do percurso (VAP) expressos em  $\mu\text{m/s}$ ; além da frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) expressos em Hertz (Hz) e amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH) expresso em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002). Sendo que, a VCL refere-se ao percurso total que a célula espermática percorre em um determinado período de observação; a VSL é o percurso determinado em linha reta do primeiro ao último ponto de observação, enquanto que a VAP é estimativa do percurso médio que o espermatozoide desenvolveu no período de observação. As análises da característica do movimento da célula espermática estão relacionadas com a variação do movimento espermático.

Sendo que LIN ( $VSL/VCL \times 100$ ) e STR ( $VSL/VAP \times 100$ ) são estabelecidas como uma proporção das velocidades, e BCF e ALH de acordo com as variações dos movimentos da cauda e da cabeça, respectivamente (MORTIMER, 2000).

Os parâmetros VCL, VAP e VSL quantificam o movimento da célula espermática, enquanto STR, LIN, ALH e BCF analisam a qualidade deste movimento (SILVA et al., 2009). As análises de velocidade espermática são expressas pelo CASA através da análise do trajeto (Figura 5).

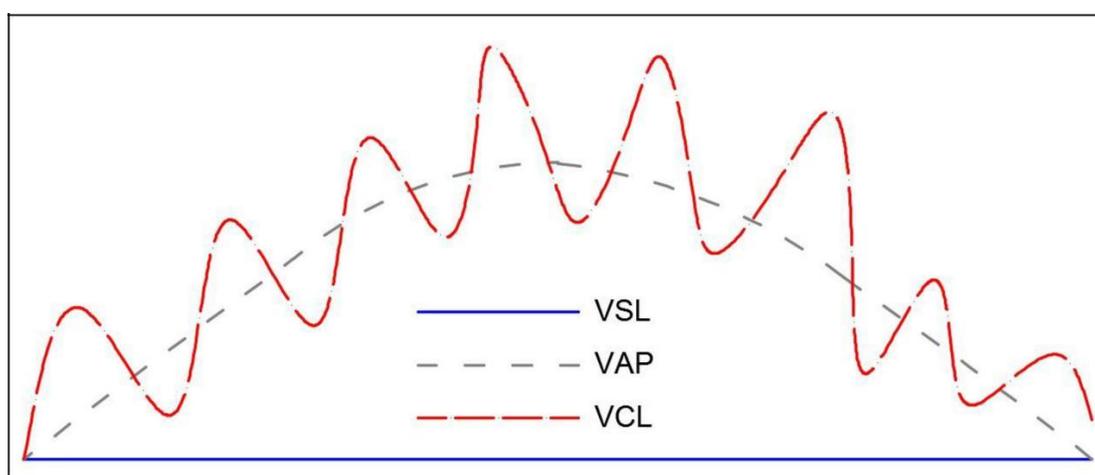


Figura 5 - Representação esquemática das análises de velocidade expressas pelo sistema CASA em uma trajetória irregular. Fonte: O Autor.

Entretanto, visto que a motilidade espermática representa apenas um dos vários pré-requisitos básicos indispensáveis para que os espermatozoides concluam com êxito sua função biológica, a avaliação computadorizada do movimento espermático proporciona inconsistente correlação com os índices de concepção animal quando utilizada isoladamente (GRAHAM; MOCÉ, 2005). Diversos autores têm relatado que estes parâmetros, embora importantes, não avaliam conclusivamente a capacidade fecundante do sêmen (AMANN, 1989; RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 1997).

### 3.6.2. Avaliação morfofuncional por sondas fluorescentes

A combinação de diversas sondas fluorescentes possibilita a avaliação simultânea de diferentes estruturas espermáticas através de diferentes técnicas com a de citometria de fluxo (ARRUDA et al., 2005). Atualmente existe uma grande quantidade de sondas fluorescentes capazes de avaliar quase todos compartimentos e funções celulares dos espermatozoides.

A fluorescência é um indicador sensível e específico do estado de certas moléculas (oxidadas x reduzidas, ionizadas x não ionizadas, livres x ligadas), podendo ser aplicada como um meio de medir mudanças metabólicas dentro de células vivas (HAUGLAND, 2001). O emprego das sondas fluorescentes na andrologia busca avaliar a integridade e função dos compartimentos específicos da célula espermática (PETERSON; SILVERSTEIN; FREUND, 1974; HALANGK et al., 1984).

Embora o uso de sondas fluorescentes através de microscopia ser um método possível para a avaliação da célula e do acrossomo, o número de espermatozoides examinados por análise não excede 200. Como forma de colmatar esta desvantagem, uma metodologia com bons resultados é a citometria de fluxo. Esta é uma técnica vantajosa sobre outras clássicas para a avaliação de viabilidade e integridade espermática, uma vez que este sistema automatizado tem a capacidade de examinar 10.000 espermatozoides em menor tempo, permitindo maior exatidão nos resultados e diminuição no tempo de preparação requerido em outras técnicas fluorescentes (ARRUDA, 2000). Portanto, a associação de sondas fluorescentes que tenham afinidades por diferentes estruturas espermáticas, permite a avaliação simultânea das diversas funções do espermatozoide, sendo uma técnica bastante empregada para a avaliação mais acurada do sêmen (GARNER et al., 1986; ARRUDA et al., 2002; CELEGHINI et al., 2007).

A citometria de fluxo é atualmente utilizada para avaliar diferentes características da célula espermática, tais como: estrutura da cromatina (LOVE, 2005), viabilidade espermática (GARNER; JOHNSON, 1995; FERRARA et al., 1997), função mitocondrial e status acrossomal (GRAHAM;

KUNZE; HAMMERSTEDT, 1990; THOMAS et al., 1998) e apoptose (RICCI et al., 2002). A descoberta de uma variedade de sondas fluorescentes tornou possível uma análise mais generalizada da qualidade do sêmen em níveis bioquímicos, ultraestruturais e funcionais.

Com a utilização da citometria de fluxo, é possível ainda a avaliação de múltiplos parâmetros em uma única amostra, como mencionado anteriormente. A associação de sondas fluorescentes vai depender do tipo de laser, dos detectores de radiação e dos filtros presentes no citômetro. Alguns citômetros podem possuir até 16 detectores de radiação dispersa e fluorescente, o que permite analisar múltiplas possibilidades de características celulares (RIESEBERG et al., 2001).

### **3.6.2.1. Avaliação da membrana plasmática**

Os primeiros estudos para avaliar a integridade da membrana plasmática em espermatozoides com o uso de sondas fluorescentes citam o emprego do brometo de etídio para o sêmen humano (PETERSON; SILVERSTEIN; FREUND, 1974) e para touros (HALANGK et al., 1984). Esta sonda não atravessa a membrana plasmática intacta, mas uma vez a membrana estando permeabilizada, ela entra na célula e tem especificidade ao DNA e, quando intercalado à dupla hélice do DNA, a emissão de sua fluorescência aumenta onze vezes (PAL; MANDAL; BHATTACHARYYA, 1998). Porém, devido ao brometo de etídio ser muito tóxico para quem o manipula, sua utilização tem sido restringida.

O iodeto de propídeo (PI), sendo uma sonda fluorescente com propriedades semelhantes ao brometo de etídio, tem sido utilizado para fins de pesquisa científica envolvendo avaliação da membrana plasmática de células. O PI possui afinidade pelo DNA e cora em vermelho o núcleo de células com membrana plasmática lesada (GARNER et al., 1986; BAYYARI et al., 1990; GRAHAM; KUNZE; HAMMERSTEDT, 1990; ARRUDA, 2000; ARRUDA; CELEGHINI, 2003; DE CASTRO et al., 2016a; HAMILTON et al., 2016).

Outras sondas fluorescentes também têm sido usadas para avaliação da integridade da membrana plasmática, como os corantes supravitais Hoechst33258 (H258) e 33342 (H342), os quais se ligam especificamente ao DNA e marcam em azul o núcleo da célula (CASEY et al., 1993). O H258 é menos permeável do que o H342, marcando as células com membrana plasmática lesada (DE LEEUW et al., 1990). Enquanto que o H342 é permeável à membrana plasmática intacta, atuando como marcador de membrana plasmática intacta quando associado com outra sonda de coloração distinta, como por exemplo o PI (CASEY et al., 1993).

O SYBR-14 também é uma sonda fluorescente com especificidade ao DNA. Ele atravessa a membrana plasmática intacta, corando o núcleo dos espermatozoides de verde, e é também usado como contra-corante, associado principalmente ao PI (THOMAS et al., 1998). Outra sonda que pode ser utilizada para o mesmo fim é o diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), o qual é hidrolisado por esterases, produzindo diacetato de carboxifluoresceína livre, que fica retida no interior da célula com a membrana plasmática intacta, liberando uma fluorescência de coloração verde amarelada (SOUZA, 2001).

O largo e crescente uso do PI é devido à apresentar baixa toxicidade quando comparado ao seu antecessor brometo de etídio (CELEGHINI, 2005) e à praticidade na preparação e aplicação da técnica. Por ser muito estável e eficiente, ele vem sendo utilizado em uma gama de estudos, apresentando êxito nos resultados tanto de microscopia de epifluorescência quanto em citometria de fluxo (GARNER et al., 1986; BAYYARI et al., 1990; THOMAS et al., 1998; PEÑA et al., 1999; ARRUDA et al., 2000; DE CASTRO et al., 2016a; HAMILTON et al., 2016).

### **3.6.2.2. Avaliação da membrana acrossomal**

O acrossoma é essencial para o funcionamento da célula espermática. A capacitação espermática e a reação acrossômica são necessárias para a

fecundação, no entanto, esses eventos só devem estar completos no momento da fertilização. Conseqüentemente, a porcentagem de células com acrossoma intacto e capazes de realizar a reação acrossômica no devido momento representam uma característica importante do sêmen (KAWAKAMI et al., 1993). Porém, a manipulação seminal pode promover modificações estruturais e funcionais na membrana plasmática, induzindo a capacitação espermática antecipada e, conseqüentemente, a reação acrossomal prematura (CORMIER; SIRARD; BAILEY, 1997).

A análise por meio de testes laboratoriais da integridade da estrutura acrossomal se mostra importante para determinar a qualidade e resistência de uma amostra seminal após condição de estresse. A integridade acrossomal pode ser avaliada por diferentes técnicas de fluorescência, como marcadores enzimáticos de acrosina (PALENCIA et al., 1996) e sondas acidofílicas (THOMAS et al., 1997). No entanto, o uso de sondas fluorescentes associadas a aglutininas tem sido uma técnica bastante empregada na avaliação desta estrutura (MAZIERO et al., 2009). A aglutinina de *Pisum sativum* (PSA), possui especificidade a glicoproteínas da membrana acrossomal e quando conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) marca o acrossomo lesado em verde amarelado (GRAHAM et al., 1990; CELEGHINI, 2005; HAMILTON et al., 2016), podendo ser utilizada em humanos (CROSS et al., 1986), em bovinos (GRAHAM et al., 1990; DE CASTRO et al., 2016a), em equinos (ARRUDA, 2000; ARRUDA; CELEGHINI, 2003) e em suínos (MATTIOLI et al., 1996).

### **3.6.2.3. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial**

Existe uma divergência sobre a análise quantitativa da porcentagem de células com alto potencial mitocondrial, pois é conhecido que a capacitação espermática leva a uma hiperpolarização das membranas espermáticas, incluindo a mitocondrial, devido ao aumento dos níveis de íons  $\text{Ca}^{++}$  (HERNANDEZ-GONZALES et al., 2006), provocando uma hiperativação. Sabe-se que o início do processo de capacitação espermática é a remoção de

colesterol e a alteração da distribuição dos fosfolipídeos de membrana, as quais resultam na abertura dos canais de  $\text{Ca}^{++}$ .

Modificações semelhantes podem acontecer na crioinjúria, causando uma capacitação espermática prematura. Porém, este processo não é desejável para a célula por diminuir a longevidade espermática. Desta forma, valores de alto potencial de membrana mitocondrial, aliados a diferentes padrões de motilidade, tais como valores elevados de velocidade de trajeto (VAP), velocidade linear (VSL), velocidade curvilínea (VCL) e amplitude lateral de cabeça (ALH), correspondem aos parâmetros frequentemente relacionados ao processo de hiperativação (HO; SUAREZ, 2001; VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002).

O potencial de membrana mitocondrial direciona a síntese de ATP mitocondrial, que é gerado pela cadeia respiratória. Análises da função mitocondrial podem ser alternativas úteis para uma avaliação mais precisa da qualidade espermática (HALLAP, 2005).

Atualmente, a função mitocondrial pode ser avaliada sob microscopia de fluorescência por meio de sondas, como Rodamina 123, Mito Tracker Green FM e Mito Tracker Red, que permitem a identificação de mitocôndrias em células vivas (ARRUDA et al., 2005).

Outra possibilidade corresponde à utilização da sonda 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1), identificado primeiramente por Jelly (1937), é uma carbocianina lipofílica catiônica, a qual é internalizada pelas mitocôndrias. Esta sonda fluorescente separa duas populações, demonstrando mitocôndrias com alto potencial de membrana em vermelho e em verde as com baixo potencial (CELEGHINI, 2005). Seu uso é mais vantajoso quando comparado com as Rodaminas e Carbocianinas, pois mostra ser capaz de se ligar seletivamente à mitocôndria e as mudanças de coloração são reversíveis, do verde ao alaranjado de acordo com o aumento do potencial de membrana acima de valores de 80 a 100mV. Esta propriedade é reversível devido à formação de agregados na membrana polarizada que causam a mudança da emissão de luz de 530nm (emissão das formas monoméricas de JC-1) para 590nm (emissão dos J-

agregados), quando excitados a 488nm. Assim, quando a coloração passa de verde para laranja a membrana mitocondrial está mais polarizada (COSSARIZZA et al., 1993; GRAVANCE et al., 2000). Quando em baixa função mitocondrial (baixo potencial de membrana mitocondrial), fluoresce em verde. Quando em alta função mitocondrial a concentração de JC-1 dentro das mitocôndrias aumenta, e a coloração forma agregados que fluorescem em laranja (GILLIAN et al., 2005).

#### **3.6.2.4. Avaliação da estrutura da cromatina espermática**

Essencial para o desenvolvimento embrionário após a fertilização e união dos pró-núcleos feminino e masculino, a cromatina deve ser íntegra. São vários os autores que sugerem que espermatozoides que possuem núcleos irregulares apresentam cromatina alterada, e que essas alterações podem ser detectadas por padrões anormais de desnaturação do DNA por testes específicos (FRASER, 2004; ROUX et al., 2003).

A fragmentação do DNA genômico do espermatozoide pode ocorrer pela ativação de endonucleases ou mediado por proteínas de superfície celular (DONNELLY et al., 2000). A quebra na dupla fita de DNA pode ser detectada pela técnica de TUNEL (BACCETTI et al., 1999) pelo ensaio Cometa (DUTY et al., 2002). Outra técnica possível de ser usada para este fim é com o uso da laranja de acridina, uma sonda fluorescente que se intercala à dupla fita de DNA, e fluoresce em verde quando esta se mostra íntegra. Porém, quando intercalada a uma porção de DNA fragmentado ou ainda, a RNA, a acridina fluoresce em laranja, permitindo a quantificação de grau de desnaturação do DNA nas células espermáticas de uma amostra, podendo auxiliar na identificação de indivíduos com distúrbios sensíveis relacionados ao processo da espermatogênese (FOSSA et al., 1997).

A coloração por laranja de acridina foi primeiramente desenvolvida para avaliar espermatozoides de humanos (TEJADA et al., 1984) e posteriormente adaptada para uso em espermatozoides de bovinos (UNANIAN, 2000). Assim, a avaliação da integridade da cromatina pelo uso da técnica de laranja de

acridina tem sido utilizada para avaliar sêmen criopreservado de bovinos (BOCHENEK; SMORAG; PILCH, 2001; JANUSKAUSKAS et al., 2003).

Frente aos compartimentos celulares espermáticos sobre os quais a criopreservação pode causar alguma injúria ou efeito negativo, o núcleo se mostra como um importante elemento dentro desse contexto, apesar de ser considerado um elemento bastante estável e menos afetado pelo congelamento e descongelamento (HAMAMAH et al., 1990).

## **4. METODOLOGIA**

O presente estudo foi realizado nos Laboratórios de Biologia do Espermatozoide e no Laboratório de Andrologia, ambos localizados no Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – USP, durante o período de 19/07/2016 à 04/11/2016.

### **4.1. Reagentes e soluções**

Todos os reagentes químicos e soluções utilizados a fim de desenvolver esse experimento são da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, EUA). Quando não, o fabricante está especificado na sequência.

### **4.2. Processamento das amostras seminais**

Para esse experimento, foram utilizadas 10 palhetas de sêmen bovino criopreservado, doadas por Centrais de Processamento e Coleta de Sêmen. Cada palheta de sêmen (0,25mL) foi descongelada por imersão em água a 37°C, por 30 segundos e submetidas ao gradiente de Percoll® (45% e 90%) (GE, Healthcare, Bio-Sciences, AB, Björkgatan) a 9000 xg por cinco minutos. O sedimento com células foi recuperado e lavado em 1mL de Fert-TALP (PARRISH, 1988) sem os agentes capacitores (heparina, penicilina, epinefrina e hipotaurina) e centrifugado a 9000 xg por 3 minutos. O segundo sedimento foi ressuspenso para uma concentração de  $25 \times 10^6$  espermatozoides/mL em meio Fert-TALP sem os agentes capacitores.

### **4.3. Indução de estresse oxidativo**

Para indução do estresse oxidativo, foram utilizados os indutores rotenona e antimicina em uma solução uso de 400nM para ambos, durante 30 minutos. A rotenona funciona interferindo na cadeia transportadora de elétrons

na mitocôndria, induzindo estresse mitocondrial intracelular, envolvendo inibição do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, resultando em deficiência na transferência de elétrons de centros ferro-enxofre no complexo I para a ubiquinona, interferindo com NADH durante a produção de energia celular utilizável (ATP). Portanto, cria-se uma espécie reativa de oxigênio que pode danificar o DNA e outros componentes da mitocôndria (SESTILLI; BRAMBILLA; CANTONI, 1999; SUZUKI et. al., 1999; BETARBET et. al., 2000; CHAUVIN et. al., 2001). Ao bloquear o complexo I, a rotenona induz permeabilidade transitória na membrana mitocondrial externa (GREENAMYR et. al., 1999; CHAUVIN et. al., 2001). Já a antimicina (Antimycin A from *Streptomyces sp.*), é um inibidor de transferência de elétrons do complexo III da cadeia transportadora de elétrons, resultando no colapso do potencial de membrana mitocondrial e aumento da produção de  $O_2^-$ , provocando um aumento específico de EROs intracelular (DIKALOV et al., 2012).

#### **4.4. Efeito dos compostos fenólicos sobre a função espermática**

Para determinar a ação dos compostos fenólicos separadamente, observou-se a resposta dos espermatozoides em relação ao suplemento adicionado, em um estudo dose-dependente com indução de estresse oxidativo pelos indutores rotenona e antimicina.

Para analisar a ação da molécula Quercetina utilizou-se seis palhetas de sêmen bovino criopreservado. E para analisar a ação de Kaempferol, utilizou-se quatro palhetas de sêmen criopreservado.

Para isso,  $25 \times 10^6$  de espermatozoides por mL (sptz/mL) em meio Fert-TALP foram tratados com concentrações crescentes dos compostos fenólicos em estudo: 0,01; 0,1; 1µg/mL separadamente e incubados em incubadora de CO<sub>2</sub>, por 30 minutos à 37°C, juntamente com 1,5µL de cada indutor. As concentrações utilizadas no presente estudo foram escolhidas baseada na metodologia proposta por Fernández (2016). Foi utilizado como controle somente o sêmen com os indutores, sem adição das moléculas.

#### 4.5. Avaliações de funções espermáticas

Posteriormente, cada tubo foi mantido a 37°C e, assim, avaliou-se a motilidade espermática pelo sistema Computer Assisted Sperm Analysis (CASA; IVOS, v 12.2, Hamilton Thorn Research, Beverly, MA), conforme mostra a Figura 6.

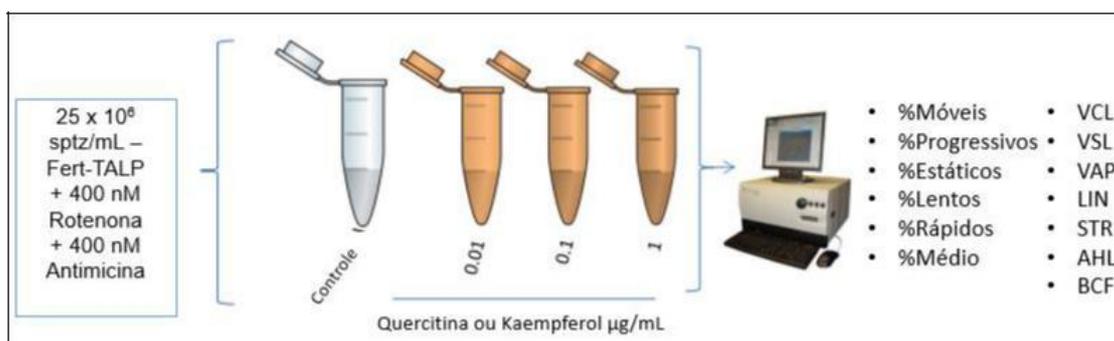


Figura 6 - Desenho esquemático das análises sobre a motilidade espermática. Fonte: O Autor.

Para as análises no citômetro de fluxo Guava EasyCyte™ Mini System (Guava® Technologies, Hayward, CA, EUA),  $5 \times 10^6$  sptz/mL em meio Fert-TALP sem agentes capacitores foram utilizados para análises com as sondas fluorescentes, conforme demonstra a Figura 7.

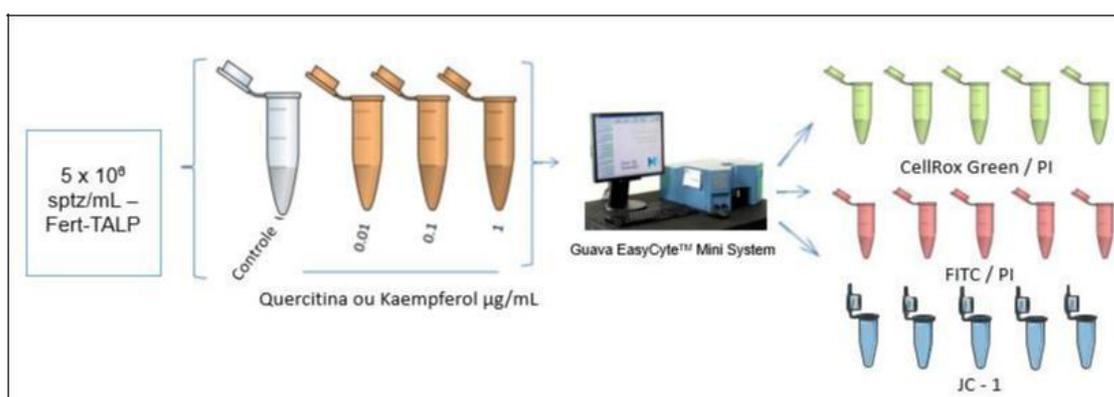


Figura 7 - Desenho esquemático das análises espermáticas com sondas fluorescentes. Fonte: O Autor.

##### 4.5.1. Análise de motilidade espermática computadorizada

Para a análise espermática computadorizada foi utilizado o sistema CASA, conforme descrito por Goovaerts et al. (2006). As lâminas aquecidas à

37°C foram preenchidas com 10µL de cada tratamento ( $25 \times 10^6$  spz/mL de Fert-TALP) e cinco campos foram selecionados para análise. Os parâmetros considerados foram: VAP (distância percorrida pelo espermatozoide ao longo da trajetória média - velocidade média de percurso), VCL (velocidade segundo a trajetória curvo-linear), VSL (velocidade segundo a trajetória retilínea - velocidade linear), BCF (frequência de batida cruzada), ALH (amplitude de deslocamento lateral de cabeça do espermatozoide), STR (retilinearidade), LIN (linearidade), motilidade total e progressiva, e ainda, a porcentagem de células estáticas e com movimento rápido, médio e lento.

#### **4.5.2. Avaliação espermática com sondas fluorescentes**

As análises foram realizadas em citômetro de fluxo Guava EasyCyte™ Mini System, conforme mencionado anteriormente. Este equipamento possui um laser de excitação de 488nm e emite uma radiação laser visível a 20 mW. O total de 20.000 eventos por amostra foi avaliado e os dados referentes à fluorescência amarela (PM1 photodetector – 583nm), vermelha (PM2 photodetector – 680nm) e verde (PM3 photodetector – 525nm) foram recuperados após amplificação logarítmica. Células duplas e debris foram excluídas utilizando FL3-A versus FL3-W gate e todos os dados foram analisados pelo software FlowJo® v10.2.

##### **4.5.2.1. Ensaio de potencial de membrana mitocondrial**

O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado pela sonda fluorescente JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl carbocyaninechloride) (Invitrogen, Eugene, OR, USA). Esta sonda é capaz de se ligar seletivamente à mitocôndria dependendo do potencial de membrana, emitindo fluorescência vermelha em células com baixo potencial de membrana, onde entra em pequenas concentrações e fica na forma de monômero. Já em mitocôndrias com alto potencial de membrana entra em grandes concentrações formando agregados que emitem fluorescência verde.

Para a análise, 90.000 células foram adicionadas a JC-1 (concentração final de 1 $\mu$ M) e incubadas por 5 minutos a 37°C, protegidas da luz, baseado na metodologia proposta por De Castro et al. (2016a), porém com redução na concentração de células, volume da sonda utilizada e tempo de incubação. Para leitura no citômetro de fluxo foram adicionados 100 $\mu$ L de PBS a 37°C, realizando a análise de fluorescência pelo canal amarelo, determinando as populações em alto, médio e baixo potencial de membrana mitocondrial ( $\Psi$ M).

#### **4.5.2.2. Ensaio de estresse oxidativo total**

Para avaliar os parâmetros oxidativos realizou-se uma análise de estresse oxidativo total interno e, para isso, a sonda selecionada foi CellRox® Green (CRG) (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA), sendo esta uma sonda que permite detectar agentes oxidantes intracelulares independente da sua localização, gerando uma fluorescência verde quando a sonda é oxidada.

Sendo assim, 90.000 células foram adicionadas a 5 $\mu$ M de CRG e mantidas à 37°C por 30 minutos no escuro e, 10 minutos antes do término da incubação com CRG, foi adicionado Iodeto de Propídeo (PI) (concentração final de 6 $\mu$ M) para diferenciar as populações que apresentam EROs sem comprometer a membrana celular daquelas que apresentam uma membrana com dano, baseado na metodologia proposta por De Castro et al. (2016a), porém com redução na concentração de células e volume da sonda utilizada. As amostras foram analisadas com excitação de 488nm e detectadas a 630-650nm para PI e 515-530nm para CRG, observando-se quatro populações: CRG-/PI-, onde apresentam baixos níveis de EROs e membrana íntegra; CRG+/PI-, onde se tem altos níveis de EROs sem dano de membrana celular; CRG+/PI+, representando altos níveis de EROs e membrana com dano e, por fim, CRG-/PI+, onde se tem baixos níveis de EROs e membrana com dano. Para leitura no citômetro de fluxo, foram adicionados 100 $\mu$ L de PBS a 37°C, realizando a leitura usando o canal verde para CellRox® Green e vermelho para PI.

#### 4.5.2.3. Ensaio da integridade da membrana plasmática e acrossomal

A integridade da membrana plasmática e do acrossoma foi avaliada por iodeto de propídio (PI) e isotiocianato de fluoresceína conjugado com aglutinina de *Pisum sativum* (FITC-PSA), respectivamente. A PSA foi usada em conjunto com o FITC (isotiocianato de fluoresceína) para que esta fixação fosse visível, permitindo a identificação dos espermatozoides pelo citômetro de fluxo. A adição de PI à FITC-PSA permite a determinação simultânea da viabilidade e integridade do acrossoma dos espermatozoides, uma vez que o PI emite fluorescência vermelha e a FITC-PSA emite fluorescência verde (HARRISON, 1990). Esta associação divide populações de espermatozoides em quatro grupos: membrana intacta e acrossomo intacto, membrana intacta e acrossomo reacionado, membrana danificada e acrossomo intacto, membrana danificada e acrossomo reacionado.

O procedimento foi realizado com 90.000 células diluídas em Fert-TALP coradas com 0,5mg/mL PI e 100 µg/mL de FITC-PSA, mantidas a 37°C protegidas da luz, adaptado de De Castro et al., (2016a), porém com redução na concentração de células. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo após cinco minutos. Para leitura no citômetro de fluxo foram adicionados 100µL de PBS a 37 °C, realizando a leitura excitando as células a 488nm e detectadas em 630-650nm (PI) e 515-530nm (FITC).

#### 4.6. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPadPrism (San Diego, Califórnia, USA) versão 5.0. Todas as análises foram feitas pelo teste ANOVA de uma via seguido de *post-hoc* de Tukey. O valor de p considerado significativo foi de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os espermatozóides produzem EROs devido a geração de energia por parte das mitocôndrias e enzimas implicadas em processos de fosforilação, gerando como produto altas concentrações de radicais livres, os quais são produzidos tanto no interior como no exterior das células (GUTHRIE; WELCH; LONG, 2008). Nesse sentido, a adição de antioxidantes não enzimáticos pode gerar um benefício ao reduzir estes radicais e conseqüentemente aumentar o sucesso das biotécnicas da reprodução.

O presente estudo avaliou o efeito dos compostos fenólicos Quercetina e Kaempferol sobre a função espermática em sêmen congelado bovino. Dentro da função espermática, fez-se a avaliação computadorizada da motilidade espermática e avaliação morfofuncional por sondas fluorescentes, e os resultados destas são apresentados abaixo.

### 5.1. Efeito sobre a motilidade espermática

Os dados sugerem que a adição das moléculas Quercetina e Kaempferol, separadamente, em crescentes concentrações (0,01; 0,1; 1µg/mL) em conjunto com os agentes oxidantes rotenona e antimicina, não gera diferença estatística nos padrões de motilidade espermática. Não foi possível identificar o efeito dose-dependente sobre o padrão de motilidade espermática em sêmen bovino congelado. As Tabelas 1 e 2 apresentam, juntamente com as médias e desvios padrão, cada variável analisada no presente estudo, sendo que, nenhum parâmetro apresentou efeito do tratamento após a adição das moléculas Quercetina e Kaempferol, respectivamente.

Tabela 1 – Análise computadorizada da motilidade espermática pelo sistema Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) do tratamento com a molécula Quercetina nas crescentes concentrações (0,01; 0,1; 1µg/mL). Dados estão expressos como média ± desvio padrão e foram analisados por ANOVA seguido de post-hoc de Tukey. Foi considerada a diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

	0µg/mL	0,01µg/mL	0,1µg/mL	1µg/mL	p
VAP (µm/s)	84,5 (±18,1)	88,6(±19,8)	85,7 (±18,7)	82,46 (± 19,3)	0,9968
VSL (µm/s)	74,3 (±17,2)	75,1 (±20,9)	73,9 (±18,4)	71,7 ((±19,5)	0,9994
VCL (µm/s)	127,4 (±27,5)	141,0(±25,6)	136,4 (±24,5)	124,5 (±25,6)	0,9688
BCF (Hertz)	29,4 (±3,2)	25,9(±5,3)	29,7 (±2,2)	28,6 (±6,0)	0,9221
ALH (µm)	5,1 (±1,1)	4,1 (±1,7)	5,0 (±1,1)	5,2 (±0,9)	0,9238
STR (%)	84,2 (±2,7)	77,2 (±6,2)	80,8 (±5,0)	81,2 (±4,5)	0,7778
LIN (%)	58,5 (±4,7)	48,0 (±6,0)	50,3 (±5,2)	54,0 (±4,4)	0,4977
Motilidade (%)	29,2 (±8,2)	19,4 (±7,1)	17,8 (±5,3)	24,2 (±9,5)	0,6952
Mot. Prog.(%)	19,8 (±7,9)	14,4 (±6,6)	12,2 (±5,4)	18,6 (±9,1)	0,8602
Rápido (%)	22,0 (±8,7)	16,2 (±7,0)	13,5 (±5,9)	20,2 (±10,0)	0,8641
Médio (%)	7,2 (±1,9)	3,0 (±0,4)	4,2 (±1,4)	3,8 (±0,8)	0,1863
Lento (%)	21,5 (±5,0)	17,8 (±2,9)	24,8 (±7,0)	28,2 (±8,8)	0,7166
Estático (%)	49,8 (±6,5)	62,8 (±5,8)	57,5 (±6,0)	47,6 (±5,0)	0,3065

Legenda: VAP- velocidade média do percurso; VSL- velocidade em linha reta; VCL- velocidade curvilínea; BCF- frequência de batimento flagelar cruzado; ALH- amplitude de deslocamento lateral da cabeça; STR- retilinearidade; LIN – linearidade; Mot. Prog.- motilidade progressiva.

Tabela 2 - Análise computadorizada da motilidade espermática pelo sistema Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) do tratamento com a molécula Kaempferol nas crescentes concentrações (0,01; 0,1; 1µg/mL). Dados estão expressos como média ± desvio padrão e foram analisados por ANOVA seguido de post-hoc de Tukey. Foi considerada a diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

	0µg/mL	0,01µg/mL	0,1µg/mL	1µg/mL	p
VAP (µm/s)	103,2 (±23,0)	87,7 (±18,4)	84,9 (±16,5)	107,1 (±19,3)	0,8071
VSL (µm/s)	91,7 (±21,0)	77,9 (±17,8)	74,7 (±16,3)	93,3 (±20,0)	0,8590
VCL (µm/s)	150,8 (±33,0)	130,5 (±26,3)	127,0 (±27,5)	165,2 (±25,2)	0,7529
BCF (Hertz)	27,0 (±4,8)	33,0 (±3,54)	31,1 (±4,4)	30,6 (±3,2)	0,7707
ALH (µm)	6,7 (±0,7)	5,2 (±1,2)	6,6 (±1,7)	7,3 (±0,6)	0,6285
STR (%)	86,2 (±3,1)	85,2 (±2,7)	84,7 (±5,7)	82,7 (±4,1)	0,9401
LIN (%)	59,5 (±5,0)	59,0 (±2,9)	59,5 (±7,5)	53,7 (±5,4)	0,8518
Motilidade (%)	37,2 (±9,7)	26,0 (±7,0)	32,7 (±10,5)	32,0 (±6,1)	0,8329
Mot. Prog. (%)	26,2 (±8,5)	17,2 (±6,1)	24,2 (±9,3)	22,5 (±6,9)	0,8632
Rápido (%)	29,2 (±10,1)	18,7 (±6,6)	25,7 (±9,6)	25,7 (7,9)	0,8546
Média (%)	8,0 (±2,7)	7,5 (±1,0)	7,2 (±2,1)	6,5 (±2,3)	0,9661
Lento (%)	17,5 (±4,6)	19,2 (±4,9)	18,7 (±5,1)	28,5 (±4,6)	0,3844
Estático (%)	45,0 (±11,1)	54,5 (±11,5)	48,5 (±6,4)	39,5 (±4,3)	0,6890

Legenda: VAP- velocidade média do percurso; VSL- velocidade em linha reta; VCL- velocidade curvilínea; BCF- frequência de batimento flagelar cruzado; ALH- amplitude de deslocamento lateral da cabeça; STR- retilinearidade; LIN – linearidade; Mot. Prog.- motilidade progressiva.

Em estudo realizado por Zribi et al. (2012) com sêmen humano, foi observado que a adição de 50µM de Quercetina ao diluidor seminal aumenta a motilidade e a viabilidade espermática, bem como reduz a fragmentação do DNA e a oxidação após o descongelamento do sêmen. Frente a isso, acredita-se que, a modificação na etapa do tratamento do presente estudo, adicionando-se as moléculas Quercetina e Kaempferol previamente ao processo de criopreservação, poderia resultar em um efeito positivo nos parâmetros espermáticos.

Durante o processamento do sêmen destinado à criopreservação, o desequilíbrio entre a geração de EROs e a atividade antioxidante pode ser desencadeado, tanto pelo comprometimento da capacidade protetora dos antioxidantes presentes no ejaculado, a partir da marcante redução de

suas concentrações após diluição do sêmen, quanto pelo estímulo à produção de EROs, durante a criopreservação (WATSON, 2000).

## **5.2. Efeito sobre potencial de membrana mitocondrial**

A análise do potencial de membrana mitocondrial, pela sonda fluorescente JC-1, permite mostrar que na adição das moléculas Quercetina (Figura 8) e Kaempferol (Figura 9), em crescentes concentrações (0,01; 0,1; 1µg/mL), não resultou em diferença estatística ( $p > 0,05$ ) sobre o potencial de membrana, onde para Quercetina  $p = 0,9108$  e para Kaempferol  $p = 0,4039$  quando comparados ao grupo controle negativo (sem presença de composto fenólico antioxidante), não caracterizando um efeito dose-dependente para o potencial de membrana mitocondrial.

Com este ensaio foi possível verificar que as moléculas analisadas não apresentam atividade citotóxica à célula espermática, pois não foi observada a diminuição nas médias de alto potencial de membrana mitocondrial entre os tratamentos. Já que a mitocôndria é uma organela que controla algumas funções celulares dos espermatozoides e a produção de ATP pela via aeróbia, além de atuar como reservatório de cálcio. Por esse motivo, o potencial mitocondrial pode ser um indicativo do estado da célula espermática e de sua capacidade de fecundação, relação esta que foi demonstrada em humanos (LECLERC; DELAMIRANDE; GAGNON, 1997) e em suínos (FERNÁNDEZ, 2016).

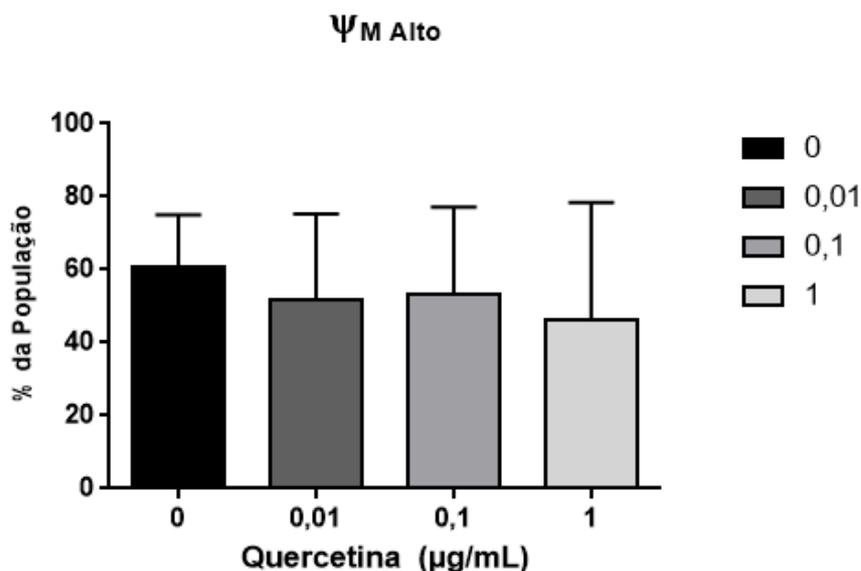


Figura 8 - Efeito da adição de Quercetina sobre o potencial de membrana mitocondrial com indução de estresse oxidativo em sêmen congelado bovino. Estudo dose dependente através da sonda JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl carbocyaninechloride) incubando concentrações crescentes de Quercetina (0,01; 0,1 e 1μg/mL), mostrando alto potencial de membrana mitocondrial. Dados estão expressos como média ± desvio padrão e foram analisados por ANOVA seguido de post-hoc de Tukey.

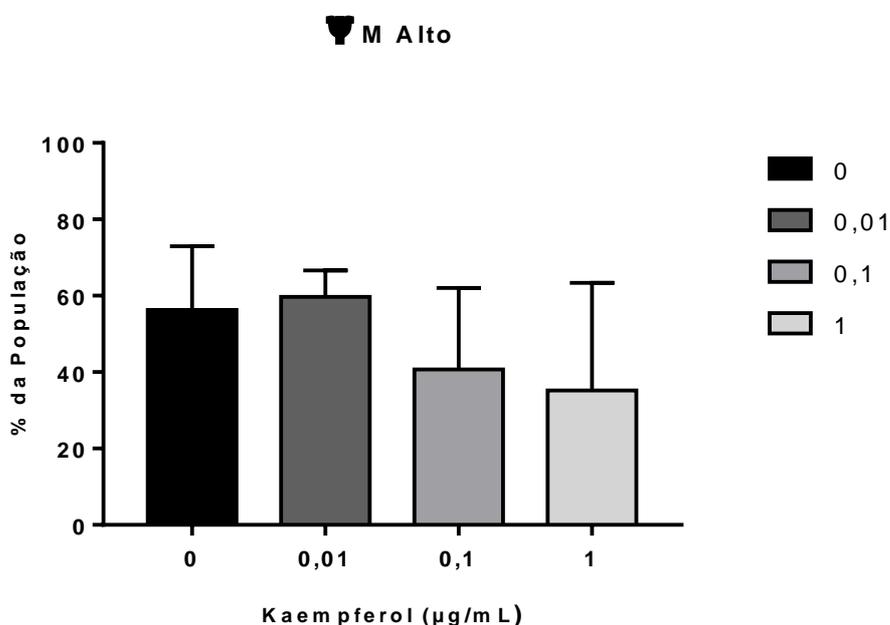


Figura 9 - Efeito da adição de Kaempferol sobre o potencial de membrana mitocondrial com indução de estresse oxidativo em sêmen congelado bovino. Estudo dose dependente através da sonda JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl carbocyaninechloride) incubando concentrações crescentes de Kaempferol (0,01; 0,1 e 1μg/mL), mostrando alto

potencial de membrana mitocondrial. Dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão e foram analisados por ANOVA seguido de post-hoc de Tukey.

### 5.3. Estresse oxidativo total interno

Realizou-se a análise do estresse oxidativo total interno, por meio de marcação com sonda fluorescente (CellRox® Green). Observando-se a capacidade interna de produção de EROs em células sem alteração de membrana plasmática mas estressadas. Os dados sugerem que a adição da molécula Quercetina (Figura 10), em crescentes concentrações (0,01; 0,1; 1  $\mu\text{g/mL}$ ), não resultou na redução do estresse oxidativo gerado de maneira endógena, onde  $p=0,97665$  quando comparados ao grupo controle (sem presença de composto fenólico antioxidante).

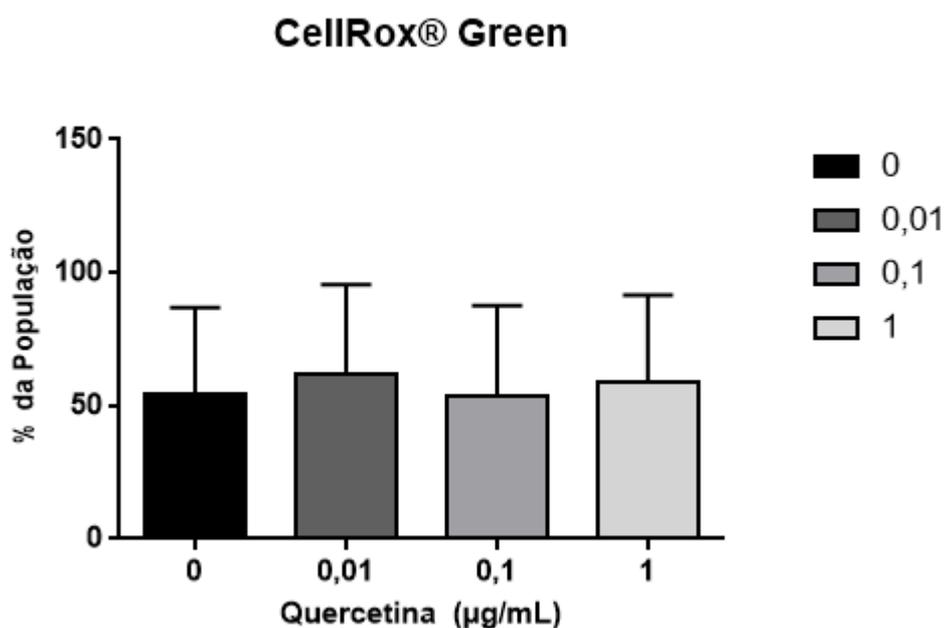


Figura 10 - Efeito da adição de Quercetina sobre o estresse oxidativo intracelular com indução de estresse oxidativo em sêmen congelado bovino. Estudo dose dependente através da sonda CellRox® Green incubando concentrações crescentes de Quercetina (0,01; 0,1 e 1  $\mu\text{g/mL}$ ). Dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão e foram analisados por ANOVA seguido de post-hoc de Tukey.

Apesar de no presente estudo a análise do estresse oxidativo intracelular, através da sonda CellRox® Green, sobre efeito da adição do Kaempferol no sêmen congelado bovino ter sido inviabilizada por perda das amostras, a literatura mostra que o composto Kaempferol apresentou a

diminuição dos níveis do ânion superóxido mitocondrial, causando a diminuição do estresse oxidativo interno em espermatozóides de suínos (FERNÁNDEZ,2016). Kaempferol tem sido descrito como um potente “limpador – superóxido”(WANG et al., 2006). A habilidade do Kaempferol em diminuir os níveis de superóxido às concentrações basais, faz esse composto ter uma importante atividade antioxidante (KLAUNIG; KLAMENDULIS; HOCEVAR, 2010).

Wang e seus colaboradores (2006) avaliaram a atividade antioxidante de vários flavonoides e descobriram que o composto Kaempferol foi um dos mais potentes servindo como seletor do radical hidroxil gerado pela reação de Fenton. Como outros flavonoides, o Kaempferol também pode reduzir a formação do radical hidroxil através da reação de Fenton por funcionar como agente quelante de íons ferrosos ou cuprosos (MIRA et al., 2002; VAN ACKER, 1996). Estudos mostraram que a presença de uma dupla ligação em C2-C3 em conjunto a presença de grupos hidroxilas em C3, C5 e C4 são grupos estruturais importantes que conferem características envolvidas na atividade antioxidante de Kaempferol (RICE-EVANS, 2001; VAN ACKER, 1996).

#### **5.4. Avaliação da integridade da membrana plasmática e do acrossoma:**

Realizou-se a análise da integridade da membrana plasmática e acrossomal com as sondas FITC – PI. Os dados sugerem que a adição das moléculas Quercetina (Figura 11) e Kaempferol (Figura 12) em crescentes concentrações (0; 0,01; 0,1; 1µg/mL), não gerou diferença estatística no potencial de membrana plasmática e acrossomal quando incubadas em meio FERT- Talp a 37°C por 30 minutos.

Os valores de p para Quercetina foram: p= 0,7022 para MPI + AR (membrana plasmática íntegra + acrossomo reacionado); p= 0,71056 para MPL + AR (membrana plasmática lesada + acrossomo reacionado; p= 0,77135 para MPL + AI (membrana plasmática lesada + acrossomo íntegro); p= 0,69862 para MPI + AI (membrana plasmática íntegra + acrossomo

íntegro) quando comparados ao grupo controle (sem presença de composto fenólico antioxidante).

Já para Kaempferol os valores de p foram:  $p= 0,9969$  para MPI + AR (membrana plasmática íntegra + acrossomo reacionado);  $p= 0,9316$  para MPL + AR (membrana plasmática lesada + acrossomo reacionado);  $p= 0,6745$  para MPL + AI (membrana plasmática lesada + acrossomo íntegro);  $p= 0,8889$  para MPI + AI (membrana plasmática íntegra + acrossomo íntegro) quando comparados ao grupo controle (sem presença de composto fenólico antioxidante).

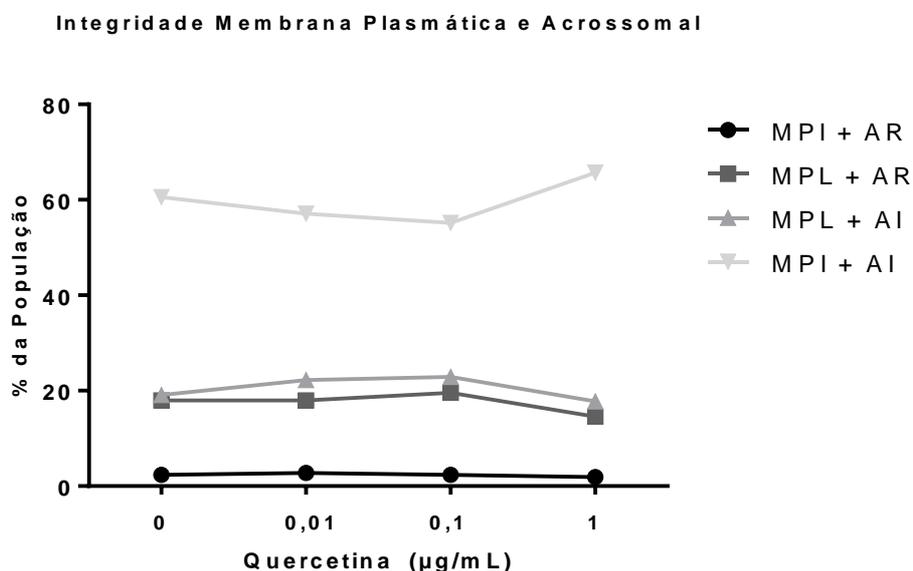


Figura 11 - Efeito da adição de Quercetina sobre a integridade de membrana plasmática e acrossomal em espermatozoides com indução de estresse oxidativo. Estudo dose dependente através das sondas FITC/PI, incubando concentrações crescentes de Quercetina (0,01 - 1µg/mL) a 37°C por 30 minutos. Dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão e foram analisados por ANOVA seguido de post-hoc de Tukey. (\*) Diferença significativa quando comparado ao controle ( $p<0,05$ ) Onde: MPI - membrana plasmática íntegra; MPL - membrana plasmática lesada; AI - acrossoma íntegro; AR - acrossoma reacionado

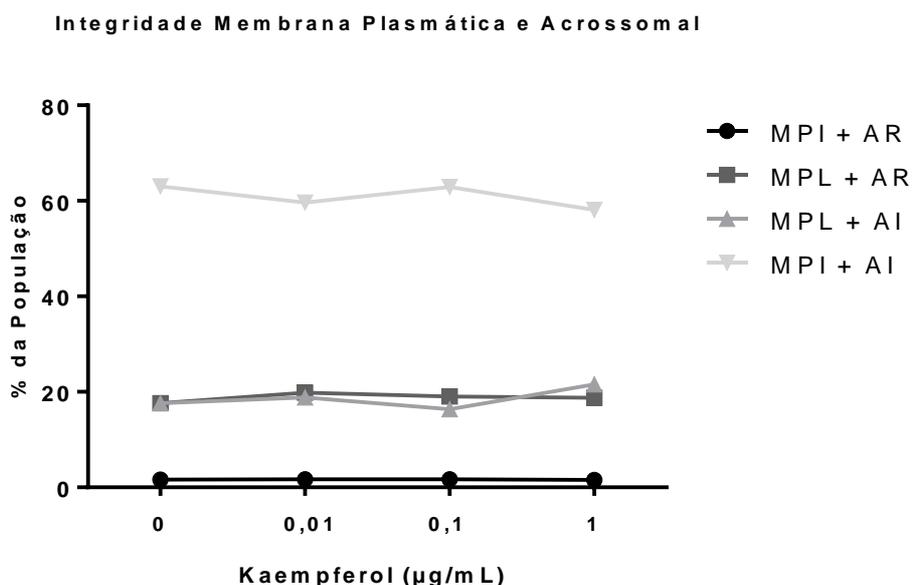


Figura 12 - Efeito da adição de Kaempferol sobre a integridade de membrana plasmática e acrossomal em espermatozoides com indução de estresse oxidativo. Estudo dose dependente através das sondas FITC/PI, incubando concentrações crescentes de Kaempferol (0,01 - 1µg/mL) a 37°C por 30 minutos. Dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão e foram analisados por ANOVA seguido de post-hoc de Tukey. (\*) Diferença significativa quando comparado ao controle ( $p < 0,05$ ) Onde: MPI - membrana plasmática íntegra; MPL - membrana plasmática lesada; AI - acrossoma íntegro; AI - acrossoma reacionado.

Compostos fenólicos como a quercetina mostraram uma grande capacidade antioxidante reconhecida em espermatozoides de ratos (KHAKI, 2010), também observado em espermatozoides de humanos na redução da peroxidação lipídica em conjunto com outros compostos fenólicos (MORETTI et al., 2012) e também em suínos, onde a adição de diferentes compostos fenólicos estendeu a vida útil dos espermatozoides (FERNÁNDEZ, 2016).

Gerou-se grande expectativa de que a quercetina pudesse exercer efeito protetor sobre espermatozoides, fato que não foi confirmado em estudo realizado por Silva et al. (2011) ao congelarem o sêmen ovino com diferentes concentrações de quercetina (5, 10, 15 e 20µg/mL), embora suponha-se que este antioxidante tenha promovido redução da peroxidação lipídica.

Os espermatozoides produzem EROs devido a geração de energia por parte das mitocôndrias e enzimas implicadas em processos de fosforilação, gerando como produto altas concentrações de radicais livres, os quais são produzidos tanto no interior como no exterior das células (GUTHRIE; WELCH; LONG, 2008). É de conhecimento que a grande capacidade oxidativa do

ânionsuperóxido é um dos fatores que influenciam os processos que são críticos em espermatozóides (PIPAN et al., 2014).

Decorrentes do rápido aumento da utilização de oxigênio pela célula, após um período de interrupção do metabolismo, o processo de descongelamento pode causar danos oxidativos, determinando maior produção de EROs (BALL; ANTHONY, 2002). Concomitante à isso, após a criopreservação, o espermatozoide apresenta diminuição da atividade das enzimas antioxidantes, tornando-o mais susceptível às EROs (BILODEAU et al., 2002).

Nesse sentido, a adição de antioxidantes não enzimáticos pode gerar um benefício ao reduzir estes radicais. Atualmente, existe uma gama de compostos capazes de reduzir os níveis de EROs em diferentes tipos celulares, conhecidos por seus efeitos antioxidantes, como os compostos fenólicos, os quais estão amplamente distribuídos em plantas e possuem efeitos nutricionais interessantes para a saúde humana e animal (KHAKI, 2010). Porém, mais estudos funcionais *in vitro* são necessários para demonstrar esta capacidade anteriormente citada.

Acredita-se também na associação dos compostos fenólicos, como por exemplo, a associação de Catequinas, Resveratrol e Quercetina para gerar efeito antioxidante (LOPES et al., 1998), porém pouco se conhece sobre os efeitos em espermatozoides. Em outros modelos biológicos, como em neurônios, apresentam um efeito neuroprotetor de maneira sinérgica (WERTHMANN; LOHSE; BÜNEMANN, 2011).

Provavelmente o sinergismo entre os compostos fenólicos em sêmen de bovinos pode ter efeitos benéficos, comprovando os mecanismos de ação de cada uma das moléculas. Porém, é prioritário determinar qual o estado oxidativo da amostra a se utilizar, devido ao fato de que nem todos os ejaculados apresentam características homogêneas, como viabilidade, potencial de membrana ou estado de acrossoma (SOUZA et al., 2011).

Porém, no presente estudo, a adição das moléculas Quercetina e Kaempferol não gerou diferença estatística no que tange a melhorar a função espermática em bovinos, não sendo possível identificar o efeito dose-

dependente da adição das moléculas sobre as diferentes funções espermáticas analisadas.

Quando se conclui que uma diferença não é estatisticamente significativa, isso não indica propriamente que as médias sejam iguais, ou que não exista um efeito substantivo. Indica apenas que não houve evidência suficientemente forte para corroborar que a hipótese nula como falsa (RUMSEY,2009).

Portanto, firma-se nesse conceito que, por influência de fatores não controlados, os quais podem causar variação tanto nos dados quanto no efeito dos tratamentos, número de amostras e repetições para os grupos analisados, bem como os efeitos do acaso amostral ou do erro experimental, podem sugerir fatores decisivos no resultado estatístico do presente trabalho (PINTO;SCHWAAB, 2011). Sendo assim, acredita-se que mudanças em delineamento experimental adicional futuro, no que tange ao aumento de repetições, homogenidade das amostras (grupos experimentais com mesmas características espermáticas), associação das moléculas em um estudo caso-controle infertilidade *versus* fertilidade, avaliação de concentrações maiores dos compostos e modificação na etapa e tempo de tratamento do presente estudo, adicionando-se as moléculas Quercetina e Kaempferol previamente ao processo de criopreservação, poderiam demonstrar, com maior fidedignidade, a atividade dos compostos fenólicos em questão.

## 6. CONCLUSÃO

Conclui-se que, a adição das moléculas Quercetina e Kaempferol em sêmen congelado bovino não gerou diferença estatística nos parâmetros de funcionalidade espermática avaliados, não sendo observado um efeito dose-dependente para o tratamento com os compostos.

Verificou-se que criopreservação do sêmen, embora possibilite o desenvolvimento da indústria animal, sofre limitações em virtude dos efeitos prejudiciais sobre as células espermáticas, fato que tem conduzido a busca pelo aperfeiçoamento desta biotécnica, com destaque para as terapias antioxidantes. Em contrapartida, apesar dos antioxidantes serem tidos como um caminho para a inibição dos danos ocasionados pelas EROs às células espermáticas, sua ação sofre a influência de diversos fatores, o que tem conduzido à obtenção de resultados variáveis e contraditórios após sua utilização.

Por conseguinte, é notória a necessidade da realização de estudos mais aprofundados a cerca do efeito dos antioxidantes sobre a sobrevivência e a funcionalidade dos espermatozoides.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFANAS' EV, I.B. et al. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, v. 38, n. 11, p. 1763-1769, 1989.

AGARWAL, A.; ALLAMANENI, S.S.R. Oxidants and antioxidants in human fertility. 2004.

AITKEN, R.J. Freeradicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, n. 4, p. 659-668, 1995.

AITKEN, R.J.; CLARKSON, J.S.; FISHEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. **Biology of Reproduction**, v. 40, p. 183-197, 1989.

AITKEN, R.J.; DE IULIIS, G.N. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, n. 1, p. 3-13, 2010.

AITKEN, R.J. et al. Superoxide dismutase in human sperm suspensions: relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 21, n. 4, p. 495-504, 1996.

AL NAIB, A.; HANRAHAN, J.P.; LONERGAN, P.; FAIR, S. *In vitro* assessment of sperm from bulls of high and low field fertility. **Theriogenology**, v. 76, p. 161-167, 2011.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. **Equine Reproduction**, v. 1, p. 715-745, 1993.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal Of Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987.

AMANN, R.P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately?. **Journal of Andrology**, v. 10, n. 2, p. 89-98, 1989.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2001. 416 p.

ARRUDA, R.P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. Tese de Doutorado. Tese de Livre Docência em Reprodução Animal. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Univ. de São Paulo.

ARRUDA, R.P. et al. Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. **Theriogenology**, v. 58, n. 2-4, p. 253-256, 2002.

ARRUDA, R.P. et al. Importance of semen quality in fixed-time artificial insemination and embryo transfer program. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.145-150, 2005.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C. Validação de técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 230-231, 2003.

ABIEC - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/noticia.asp?id=1481#.WDR8GlyrIEY>. Acesso em 05 out. 2016.

BACCETTI, B. et al. A quick molecular method for the simultaneous detection in spermatozoa of nuclear, acrosomal and axonemal structure by fluorescent microscopy. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 31, n. 4, p. 563-569, 1999.

BALL, B.A.; ANTHONY, V.O. Detection of Lipid Peroxidation in Equine Spermatozoa Based Upon the Lipophilic Fluorescent Dye C11-BODIPY581/591. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 2, p. 259-269, 2002.

BANSAL, A. K.; BILASPURI, G.S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, 2010.

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, 2006.

BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa**. 1989.

BAUMBER, J. et al. 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.

BAYYARI, G.R. et al. Research note: The evaluation of chicken spermatozoa using fluorescent staining in a 96-well format. **Poultry science**, v. 69, n. 9, p. 1602-1605, 1990.

BETARBET, R. et al. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. **Nature Neuroscience**, v. 3, n. 12, p. 1301-1306, 2000.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-30, 1999.

BILODEAU, J.F. et al. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**, v. 57, n. 3, p. 1105-1122, 2002.

BLEIL, J.D.; WASSARMAN, P.M. Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. **Developmental Biology**, v. 95, n. 2, p. 317-324, 1983.

BOCHENEK, M.; SMORAG, Z.; PILCH, J. Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. **Theriogenology**, v. 56, n. 4, p. 557-567, 2001.

BOOTH, N.H.; MCDOWELL, L.E. **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**. Sexta edição. 1992.

BORGES, J.C. et al. **Utilização de antioxidantes associados ou não aemulsificante na criopreservação do sêmen bovino**. 2003.

BORGES, J.C. et al. Membrana plasmática de espermatozóides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 3, p. 303-14, 2011.

BRAUNDMEIER, A.G.; MILLER, D.J. Invited review: the search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 9, p. 1915-1925, 2001.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Tissue-specific functions of individual glutathioneperoxidases. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 9, p. 951-965, 1999.

BUCAK, M.N., et al. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. **Theriogenology**, v. 67, n. 5, p. 1060-1067, 2007.

BUETTNER, G.R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation,  $\alpha$ -tocopherol, and ascorbate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 300, n. 2, p. 535-543, 1993.

CALDERON-MONTANO, J. et al. A review on the dietary flavonoid kaempferol. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 11, n. 4, p. 298-344, 2011.

CASEY, P. J., et al. Validation of an Acrosomal Stain for Equine Sperm that Differentiates between Living and Dead Sperm. **Journal of andrology**, v. 14, n. 4, p. 269-297, 1993.

CELEGHINI, E.C.C. et al. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 5, p. 479-488, 2007.

CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre a membrana plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. 2005.186p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo USP, Pirassununga

CORMIER, N.; SIRARD, M.A.; BAILEY, J.L. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. **Journal of Andrology**, v. 18, n. 4, p. 461-468, 1997.

COSSARIZZA, A. et al. A new method for the cytofluorometric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 197, n. 1, p. 40-45, 1993.

CROSS, N. L. et al. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. **Gamete Research**, v. 15, n. 3, p. 213-226, 1986.

CHAN, S.; Y. W et al. The relationship between the human sperm hypoosmotic swelling test, routine semen analysis, and the human sperm zona-free hamster ovum penetration assay. **Fertility and Sterility**, v. 44, n. 5, p. 668-672, 1985.

CHAUVIN, C. et al. Rotenone inhibits the mitochondrial permeability transition-induced cell death in U937 and KB cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 44, p. 41394-41398, 2001.

DE CASTRO, L.S. et al. Sperm oxidative stress is detrimental to embryo development: a dose-dependent study model and a New and more sensitive oxidative status evaluation. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, v. 2016, 2016a.

DE CASTRO, L.S. et al. Sperm cryodamage occurs after rapid freezing phase: flow cytometry approach and antioxidant enzymes activity at different stages of cryopreservation. **Journal of Animal Science And Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 1, 2016b.

DE IULIIS, G.N. et al. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. **Biology Of Reproduction**, v. 81, n. 3, p. 517-524, 2009.

LAMIRANDE, E.D.; GAGNON, C. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 16, n. 1, p. 21-25, 1993.

DE LAMIRANDE, E. et al. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews Of Reproduction**, v. 2, n. 1, p. 48-54, 1997.

DE LEEUW, F.E. et al. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. **Cryobiology**, v. 27, n. 2, p. 171-183, 1990.

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

DIKALOV, S. I. et al. Mitochondrial reactive oxygen species and calcium uptake regulate activation of phagocytic NADPH oxidase. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 302, n.10, p. R1134-R1142, 2012.

HAMILTON, T. R. S. et al. Evaluation of Lasting Effects of Heat Stress on Sperm Profile and Oxidative Status of Ram Semen and Epididymal Sperm. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

DU PLESSIS, S. S. et al. Effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure on human sperm motility parameters, reactive oxygen species levels and nitric oxide levels. **Andrologia**, v. 42, n. 3, p. 206-210, 2010.

DUTY, S. M. et al. Reliability of the comet assay in cryopreserved human sperm. **Human Reproduction**, v. 17, n. 5, p. 1274-1280, 2002.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/11466626/artigo-genomica-e-melhoramento-genetico-em-bovinos>. Acesso em 15 out. 2016.

EUCLIDES FILHO, K. Evolução do melhoramento genético de bovinos de corte no Brasil. **Ceres**, v. 56, n. 5, 2015.

FARRELL, P. B. et al. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology**, v. 49, n. 4, p. 871-879, 1998.

FERNÁNDEZ, I. A. J. **Estudio Metabolico Y Funcional De Un Extracto Polifenólico De Ugni Molinae Turcz Sobre Espermatozoides Porcinos Preservados En Medio De Extensión Mr-A**. 2016. 41 P. Avance De Tesis Doctoral N°3 (Programa De Doctorado En Ciencias Mención Biología Celular Y Molecular Aplicada)- Universidad De La Frontera, Temuco, 2016. V. 3.

FERRAMOSCA, A. et al. Oxidative stress negatively affects human sperm mitochondrial respiration. **Urology**, v. 82, n. 1, p. 78-83, 2013.

FERRARA, F. et al. Automation of human sperm cell analysis by flow cytometry. **Clinical Chemistry**, v. 43, n. 5, p. 801-807, 1997.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. 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.

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Reviews on Biomembranes**, v. 1469, n. 3, p. 197-235, 2000.

FOSSA, S. D. et al. Prediction of posttreatment spermatogenesis in patients with testicular cancer by flow cytometric sperm chromatin structure assay. **The Journal of Urology**, v. 160, n. 3, p. 947-948, 1997.

FRASER, L. Structural damage to nuclear DNA in mammalian spermatozoa: its evaluation techniques and relationship with male infertility. **Polish journal of veterinary sciences**, v. 7, n. 4, p. 311-321, 2004.

GARNER, D. L. et al. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biology of Reproduction**, v. 34, n. 1, p. 127-138, 1986.

GARNER, D. L.; JOHNSON, L. A. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. **Biology of reproduction**, v. 53, n. 2, p. 276-284, 1995.

GARNER, D. L.; JOHNSON, L. A.; ALLEN, C. H. Fluorometric evaluation of cryopreserved bovine spermatozoa extended in egg yolk and milk. **Theriogenology**, v. 30, n. 2, p. 369-378, 1988.

GARNER, D.L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozóide e Plasma Seminal (Cap. 7). In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**, 7ª ed. São Paulo: Editora Manole, 582 p. 2004.

GARNER, D. L. et al. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 57, n. 6, p. 1401-1406, 1997.

GIL, J. et al. Functional Sperm Parameters and Fertility of Bull Semen Extended in Biociphos-Plus® and Triladyl®. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 35, n. 2, p. 69-77, 2000.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 445-457, 2005.

GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J. et al. Is Sperm Freezability Related to the Post-Thaw Lipid Peroxidation and the Formation of Reactive Oxygen Species in Boars?. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 2, p. 177-182, 2013.

GONZALEZ, R. A. F.. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozóide bovino**. 2004. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

GOOVAERTS, I. G. F. et al. Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton–Thorne analyser indicates variation between the two caudae epididymides of the same bull. **Theriogenology**, v. 66, n. 2, p. 323-330, 2006.

GRAHAM, J. K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R. H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of reproduction**, v. 43, n. 1, p. 55-64, 1990.

GRAHAM, J. K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 492-504, 2005.

GRAVANCE, C. G. et al. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**, v. 53, n. 9, p. 1691-1703, 2000.

GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R.; LONG, J. A. Mitochondrial function and reactive oxygen species action in relation to boar motility. **Theriogenology**, v. 70, n. 8, p. 1209-1215, 2008.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7.ed. Barueri, SP: Manole, 2004. p. 173-178.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. Editora Manole Ltda. São Paulo-SP, 6ª Edição, 582p. 1995.

HALANGK, W. et al. Effect of various substrates on mitochondrial and cellular energy state of intact spermatozoa. **Biomedica biochimica acta**, v. 44, n. 3, p. 411-420, 1984.

HALLAP, T. et al. Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility?. **Theriogenology**, v. 62, n. 3, p. 702-713, 2004.

HALLAP, T. et al. Mitochondrial activity of frozen-thawed spermatozoa assessed by MitoTracker Deep Red 633. **Theriogenology**, v. 63, n. 8, p. 2311-2322, 2005.

HALLIWELL, B. **Free Radicals and Other Reactive Species in Disease**, eLS. 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemical journal**, v. 219, n. 1, p. 1, 1984.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals In Biology And Medicine**. Oxford University Press, USA, 2015.

HAMAMAH, S. et al. Effects of freezing-thawing on the spermatozoon nucleus: a comparative chromatin cytophotometric study in the porcine and human species. **Reproduction Nutrition Development**, v. 30, n. 1, p. 59-64, 1990.

HARRISON, R. A. P.; ROLDAN, E. R. **Reprod. Fertil.** 1990; v. 2: 51.

HASLER, J. F. Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 75, n. 10, p. 2857-2879, 1992.

HAUGLAND, R. P. **Handbook of fluorescent probes and research chemicals**. 8<sup>a</sup> ed. Eu-gene: Molecular Probes Inc., 2001

HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, E. O. et al. Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 9, p. 5623-5633, 2006.

HO, H. C.; SUAREZ, S. S. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. **Reproduction**, v. 122, n. 4, p. 519-526, 2001.

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

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2014. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/10/rebanho-bovino-brasileiro-cresce-e-chega-a-212-3-milhoes-de-cabecas-de-gado>. Acesso em 10 out. 2016.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; ROGRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology**, v. 60, p. 743-758, 2003.

JONES, R.; MANN, T. Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 50, n. 2, p. 261-268, 1977.

KAWAKAMI, E. et al. Induction of acrosome reactions of canine sperm by homologous zona pellucida. **Biology of reproduction**, v. 48, n. 4, p. 841-845, 1993.

KHAKI, A. Beneficial Effects of Quercetin on Sperm Parameters in Streptozotocin-Induced Diabetic Male Rats. **Journal of Andrology**. p53. 2010

KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, L. M.; HOCEVAR, B. A. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. **Toxicologic Pathology**, v. 38, n. 1, p. 96-109, 2010.

KOPPERS, A. J.; DE LULIIS, 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. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 93, p. 3199-3207, 2008.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. **International Journal Of Andrology**, v. 16, n. 1, p. 21-25, 1993.

LEAHY, T.; GADELLA, B. M. Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. **Reproduction**, v. 142, n. 6, p. 759-778, 2011.

LECLERC, P.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, n. 4, p. 643-656, 1997.

LIEN, E. J. et al. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 3, p. 285-294, 1999.

LÔBO, R. B. et al. Progresso científico em melhoramento animal no Brasil na primeira década do século XXI. 2010.

LOPES, S. et al. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 13, n. 4, 896-900, 1998.

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

MATSUDA, M. M. et al. Quercetin induces apoptosis of *Trypanosoma brucei* gambiense and decreases the proinflammatory response of human macrophages. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 924-929, 2004.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Male reproductive function and the composition of semen: general considerations. In: **Male Reproductive Function and Semen**. Springer London, 1981. p. 1-37.

MANNELLA, C. A. Introduction: our changing views of mitochondria. **Journal Of Bioenergetics And Biomembranes**, v. 32, n. 1, p. 1-4, 2000.

MATTIOLI, M. et al. Identification of capacitation in boar spermatozoa by chlortetracycline staining. **Theriogenology**, v. 45, n. 2, p. 373-381, 1996.

MAZIERO, R. R. D. et al. Análise de sêmen bovino e sua relação com a fertilidade. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 6, p. 5-10, 2009.

MILAZZOTTO, M. P. et al. Biologia molecular aplicada à biotecnologia. **Ciência Veterinária nos Trópicos, Recife**, v. 11, p. 145-148, 2008.

MILLS, S. C.; SCOTT, T. W. Metabolism of fatty acids by testicular and ejaculated ram spermatozoa. **Journal of reproduction and fertility**, v. 18, n. 2, p. 367-369, 1969.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUARIA E DESENVOLVIMENTO. 2016. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2016/08/brasil-esta-apto-a-exportar-embrioes-bovinos-in-vitro-para-o-paraguai>. Acesso em 10 out. 2016.

MIRA, L. et al. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. **Free radical research**, v. 36, n. 11, p. 1199-1208, 2002.

MORETTI, E.; MAZZI, L.; TERZUOLI, G.; BONECHI, C; IACOPONI, F.; MARTINI, S. Effect of quercetin, rutin, naringenin and epicatechin on lipid peroxidation induced in human sperm. **Reproductive Toxicology**. V. 4, p. 651-7. 2012

MORTIMER, S.T. Casa- Practical aspects. **Journal Andrology**, p.515-524, 2000.

NAWAR, W. W. Lipids. In: FENNEMA, O.R. (Ed.). **Food Chemistry**. 2.ed. New York : Marcel Dekker, 1985. p.139-244.

NELSON, D. L.; LEHNINGER, Albert L.; COX, Michael M. **Lehninger Principles Of Biochemistry**. Macmillan, 2008.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology And Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

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

O'FLAHERTY, C.; BEORLEGUI, N.; BECONI, M. T. Participation of superoxide anion in the capacitation of cryopreserved bovine sperm. **International journal of andrology**, v. 26, n. 2, p. 109-114, 2003.

O'FLAHERTY, C.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 41, n. 4, p. 528-540, 2006.

OLLERO, M. et al. Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. **Cryobiology**, v. 37, n. 1, p. 1998.

PAL, S. K.; MANDAL, D.; BHATTACHARYYA, K. Photophysical processes of ethidium bromide in micelles and reverse micelles. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 52, p. 11017-11023, 1998.

PALENCIA, D. D. et al. Determination of activable proacrosin/acrosin in bovine sperm using an irreversible isocoumarin serine protease inhibitor. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 3, p. 536-542, 1996.

PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction**, v. 38, n. 5, p. 1171-1180, 1988.

PARTYKA, A.; ŁUKASZEWICZ, E.; NIŻAŃSKI, W. Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. **Theriogenology**, v. 77, n. 8, p. 1497-1504, 2012.

PEÑA, A. et al. Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. **Theriogenology**, v. 52, n. 6, p. 965-980, 1999.

PEÑA, F. J. Detecting subtle changes in sperm membranes in veterinary andrology. **Asian Journal Of Andrology**, v. 9, n. 6, p. 731-737, 2007

PEÑA, F. J. et al. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. **Reproduction In Domestic Animals**, v. 44, n. 2, p. 345-349, 2009.

PETERSON, R. N.; SILVERSTEIN, K.; FREUND, M. A rapid fluorometric method for the determination of DNA in human semen. **Journal Of Reproduction And Fertility**, v. 41, n. 2, p. 485-488, 1974.

PINTO, J. C.; SCHWAAB, M. **Análise de Dados Experimentais v. II: Planejamento de Experimentos**. Editora E-papers, 2011.

PIPAN, M. Z.; MRKUN, J.; KOSEC, M., SVETE, A.N.; ZRIMSEK, P. Superoxide Dismutase: A Predicting Factor for Boar Semen Characteristics for Short-Term Preservation. **Biomed Research International**. 2014.

RAI - REVISTA ADITIVOS E INGREDIENTES. Os flavonoides como antioxidantes. N<sup>o</sup> 71, 2010. Disponível em: [www.insumos.com.br/aditivos\\_e\\_ingredientes/materias/200.pdf](http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/200.pdf). Acesso em 01 nov. 2016.

RICCI, G. et al. Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. **Human reproduction**, v. 17, n. 10, p. 2665-2672, 2002.

RICE-EVANS, C. Flavonoid antioxidants. **Current medicinal chemistry**, v. 8, n. 7, p. 797-807, 2001.

RIESEBERG, M. et al. Flow Cytometry In Biotechnology. **Applied Microbiology And Biotechnology**, V. 56, N. 3-4, P. 350-360, 2001.

ROBINSON, T. The organic constituents of higher plants, their chemistry and interrelationships, Burgess, Minneapolis, pp. 178-209. 1967

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Methods for semen evaluation and their relationship to fertility. **Resúmenes del**, 2005.

ROUX, C. et al. Segregation of chromosomes in sperm of Robertsonian translocation carriers. **Cytogenetic And Genome Research**, v. 111, n. 3-4, p. 291-296, 2005.

RUIZ-PESINI, E. et al. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 8, p. 1616-1620, 1998.

RUMSEY, Deborah. **Estatística para leigos**. Alta Books Editora, 2009.

SCOTT, T.W. Lipid metabolism of spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.18, p 65-76, 1973.

SESTILI, P.; BRAMBILLA, L.; CANTONI, O. Rotenone and pyruvate prevent the tert-butylhydroperoxide-induced necrosis of U937 cells and allow them to proliferate. **FEBS letters**, v. 457, n. 1, p. 139-143, 1999.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **Critical reviews in food science & nutrition**, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SIGNORELLI, J.; DIAZ, E. S.; MORALES, P. Kinases, phosphatases and proteases during sperm capacitation. **Cell and tissue research**, v. 349, n. 3, p. 765-782, 2012.

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

SILVA, P. F. N. **Physiology of peroxidation process in mammalian sperm**. 2006. Tese de Doutorado. PhD thesis. Utrech University, Ridderprint, Ridderkerk.

SILVA, A. R. et al. Description of ultrastructural damages in frozen-thawed canine spermatozoa. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 595-601, 2009.

SILVA, C. M. B.; MACÍAS-GARCÍA, B.; MIRÓ-MORÁN, A.; GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, L.; MORILLO-RODRIGUEZ, A.; ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GALLARDO-BOLANOS, J. M.; STILWELL, G.; TAPIA J. A.; PEÑA, F. J. Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa. **Journal of Pineal Research**, v. 51, p. 172-179, 2011.

SILVEIRA, J. C. et al. Fatores ambientais e parâmetros genéticos para características produtivas e reprodutivas em um rebanho Nelore no estado do Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 1432-1444, 2004.

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? **Comptes rendus biologiques**, v. 327, n. 7, p. 649-662, 2004.

SOUZA, N. L. **Avaliação de técnicas para determinar a viabilidade e integridade do acrossomo de espermatozoides criopreservados de eqüinos**. Campus Pirassununga-Universidade de São Paulo-USP. 2001. 76p. 2001. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).

SOUZA, A. P. et al. Not all sperm are equal: functional mitochondria characterize a subpopulation of human sperm with better fertilization potential. **PloS One**, v. 6, n. 3, p. e18112, 2011.

STRADAIOLI, G. et al. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. **Theriogenology**, v. 67, n. 7, p. 1249-1255, 2007.

SUZUKI, S. et al. Implication of mitochondria-derived reactive oxygen species, cytochrome C and caspase-3 in N-(4-hydroxyphenyl) retinamide-induced apoptosis in cervical carcinoma cells. **Oncogene**, v. 18, n. 46, p. 6380-6387, 1999.

TAYLOR, C. T. Antioxidants and reactive oxygen species in human fertility. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 10, n. 4, p. 189-198, 2001.

TEJADA, R. I. et al. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. **Fertility And Sterility**, v. 42, n. 1, p. 87-91, 1984.

THÉRIEN, I.; BLEAU, G.; MANJUNATH, P. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. **Biology of reproduction**, v. 52, n. 6, p. 1372-1379, 1995.

THOMAS, C. A. et al. Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. **Biology of reproduction**, v. 58, n. 3, p. 786-793, 1998.

THOMSON, L. K. et al. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. **Human Reproduction**, v. 24, n. 9, p. 2061-2070, 2009.

UNANIAN, M. M. **Integridade da cromatina: método complementar para avaliação da qualidade do sêmen bovino**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000.

VAN ACKER, S. ABE et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 3, p. 331-342, 1996.

VERNET, P.; AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. Antioxidant strategies in the epididymis. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 216, n. 1, p. 31-39, 2004.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 149-179, 2002.

WANG, L. et al. Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 26, p. 9798-9804, 2006.

WARD, W. S.; COFFEY, D. S. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. **Biology Of Reproduction**, v. 44, n. 4, p. 569-574, 1991.

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

WERTHMANN, R. C.; LOHSE, M. J.; BÜNEMANN, M. Temporally resolved cAMP monitoring in endothelial cells uncovers a thrombin-induced [cAMP] elevation mediated via the Ca<sup>2+</sup>-dependent production of prostacyclin. **The Journal of Physiology**, v. 589, n. 1, p. 181-193, 2011.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. **The Physiology Of Reproduction**, v. 1, p. 189-317, 1994.

YOUSEF, M. I.; ABDALLAH, G. A.; KAMEL, K. I. Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. **Animal reproduction science**, v. 76, n. 1, p. 99-111, 2003.

ZABLUDOVSKY, N. et al. Relationship between human sperm lipid peroxidation, comprehensive quality parameters and IVF outcome. **Andrologia**, v. 31, n. 2, p. 91-98, 1999.

ZHANG, B. R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIM, N.; HAARD, M. G.; RODRIGUEZ MARTINEZ, H. Prediction of bull fertility by combined *in vitro* assessments of frozenthawed semen from young dairy bulls entering an AI-programme. **International Journal of Andrology**, v. 22, p. 253-260, 1999.

ZINI, A.; AGARWAL, A. **Sperm chromatin**. New York, NY: Springer New York, 2011. 535 p.

ZRIBI, N. et al. Effect of freezing–thawing process and quercetin on human sperm survival and DNA integrity. **Cryobiology**, v. 65, n. 3, p. 326-331, 2012.