



Abanico Veterinario. Janeiro-Dezembro 2021; 11:1-14. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2021.36>
Artigo Original. Recebido: 11/06/2021. Aceito: 30/09/2021. Publicado: 30/10/2021. Chave: e2021-38.

Avaliação da adição de quercetina e vitamina E ao meio de criopreservação do sêmen de ovelha em fertilidade *in vivo*

Evaluation of the addition of quercetin and vitamin E to the cryopreservation medium of ram semen on *in vivo* fertility

Jiménez-Aguilar Eduardo*¹ ID, Quezada-Casasola Andrés¹ ID, Prieto-Caraveo Mario² ID, Orozco-Lucero Ernesto¹ ID, Itzá-Ortiz Mateo¹ ID, Carrera-Chávez José**¹ ID

¹Departamento de Ciencias Veterinarias, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Ciudad Juárez, Chihuahua, México. ²Animal Health and Inspection Service, U.S. Department of Agriculture. El Paso, Texas, USA. *Autor responsável. **Autor para correspondência: Carrera-Chávez José, Anillo envolvente y Estocolmo, Ciudad Juárez, Chihuahua, México CP 32310. Correo: jose.carrera@uacj.mx, al182903@alumnos.uacj.mx, aquezada@uacj.mx, mario.a.prieto@usda.gov, ernesto.orocho@uacj.mx, mateo.itza@uacj.mx

RESUMO

A criopreservação induz o stress oxidativo que tem efeitos adversos na qualidade do sêmen pós-descongelado. O objectivo era avaliar o efeito da adição de quercetina ao meio de criopreservação do sêmen de ovelha. O sêmen foi colhido de três garanhões de ovelha por vagina artificial e foi utilizado um extensor comercial. Os tratamentos foram: controlo; quercetina 200 µM; vitamina E 100 µM; e combinação de quercetina e vitamina E. A vitalidade, motilidade, integridade acrossômica e fertilidade foram avaliadas *in vivo*. As variáveis numéricas foram analisadas pela ANOVA e a taxa de gestação pelo qui-quadrado. Na avaliação das características de mobilidade dos espermatozóides, não foi encontrada qualquer diferença significativa entre os tratamentos. O tratamento com a maior percentagem de espermatozóides vivos com acrossoma intacto foi quercetina 200 µM (22,33±2,51%) em comparação com os outros tratamentos (P<0,05). A fertilidade *in vivo* não foi estatisticamente significativa, mas foi encontrada uma diferença numérica na percentagem de gestação com a adição de 200 µM de quercetina (51,92%) em comparação com os outros tratamentos. Em conclusão, a adição de 200 µM de quercetina ao meio de criopreservação do sêmen ovino melhorou a vitalidade e integridade do acrossoma, mas não a percentagem de fertilidade *in vivo*.

Palavras-chave: antioxidante, congelação, taxa de gestação, características dos espermatozóides

ABSTRACT

Cryopreservation induces oxidative stress that has adverse effects on post-thawed semen quality. The objective was to evaluate the effect of adding quercetin to sheep semen cryopreservation medium. Semen was collected from three sheep stallions by artificial vagina, and a commercial diluent was used. Treatments were: control; quercetin 200 µM; vitamin E 100 µM; and the quercetin and vitamin E combination. Vitality, motility, acrosome integrity and fertility were evaluated *in vivo*. Numerical variables were analyzed with ANOVA and gestation rate with chi-square. In the evaluation of sperm motility characteristics, no significant difference was found between treatments. The treatment with the highest percentage of live spermatozoa with intact acrosome was quercetin 200 µM (22.33±2.51%) compared to the other treatments (P<0.05). *In vivo* fertility was not statistically significant, but a numerical difference in the percentage of gestation was found with the addition of 200 µM quercetin (51.92%) compared to the other treatments. In conclusion, the addition of 200 µM quercetin to the ovine semen cryopreservation medium improved the vitality and integrity of the acrosome, but not the *in vivo* fertility percentage.

Keywords: antioxidant, freezing, gestation rate, sperm characteristics.



INTRODUÇÃO

A criopreservação visa manter a viabilidade e funcionalidade dos espermatozóides a baixas temperaturas; contudo, a criopreservação causa danos e deficiências nos espermatozóides. No momento da criopreservação, os espermatozóides são expostos a impactos físicos e químicos que impedem a viabilidade, diminuem a motilidade, danificam o acrossoma e diminuem a sua fertilidade (Mata-Campuzano *et al.*, 2015). Isto deve-se em parte ao facto de a criopreservação induzir stress oxidativo, como resultado da formação excessiva de espécies reactivas de oxigénio (ROS; El-Khawagah *et al.*, 2020), uma vez que os ácidos gordos polinsaturados de membrana são susceptíveis a danos ROS, e o citoplasma do esperma contém baixas concentrações de enzimas de absorção de radicais livres (Karimfar *et al.*, 2015).

A adição de antioxidantes no extensor de congelação do sémen resulta em melhores características pós-degelo, uma vez que protegem os ácidos gordos polinsaturados nos espermatozóides, evitando assim danos por stress oxidativo. Inúmeras plantas demonstraram ter um efeito antioxidante, uma vez que contêm flavonóides com capacidades antioxidantes como a quercetina, e vitaminas antioxidantes como C, E e A (Berkovich *et al.*, 2013). A quercetina é um flavonóide antioxidante comumente presente nos vegetais, capaz de limpar ROS (El-Khawagah *et al.*, 2020) e tem sido relatado para melhorar a qualidade do sémen de ovelha pós-degelo (Silva *et al.*, 2012; Gibb *et al.*, 2013). A vitamina E é um antioxidante lipofílico que protege os ácidos gordos insaturados contra a peroxidação, uma vez que é um potente necrófago de radicais peroxil e um importante inibidor da reacção em cadeia da lipo-peroxidação em animais (Allai *et al.*, 2018), e é normalmente utilizado como antioxidante na criopreservação do sémen (Abdi-Benemar *et al.*, 2015; Benhenia *et al.*, 2016).

Em comparação com outras técnicas de inseminação, a inseminação artificial por laparoscopia é utilizada como alternativa para a utilização de sémen criopreservado, pois os danos que ocorrem nos espermatozóides no momento da criopreservação limitam a fertilidade pós-inseminação com técnicas vaginais ou cervicais (Allai *et al.*, 2018). No entanto, não há nenhum relatório de avaliação da fertilidade *in vivo* após a adição de antioxidantes como a quercetina e a vitamina E no sémen de ovino criopreservado. Portanto, o objectivo deste estudo era avaliar o efeito da adição de quercetina no meio de criopreservação do sémen de ovelha nas características do esperma e na fertilidade *in vivo*.



MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo e animais

O estudo foi realizado no Laboratório de Investigação e Reprodução Animal da Universidade Autónoma de Ciudad Juárez (UACJ). A inseminação artificial foi realizada numa quinta localizada em Ciudad Juárez nas coordenadas 31°43'12.9" N e 106°27'39.0" W, no norte do Estado de Chihuahua. O processamento do sémen e a inseminação artificial foram efectuados durante a época de reprodução (Julho a Fevereiro).

O sémen foi colhido de três garanhões Katahdin, com aproximadamente três anos de idade, com uma condição corporal de 4 (escala 1-5). Para avaliar a fertilidade do sémen criopreservado, foram inseminadas 201 fêmeas de raça peluda (Katahdin, Pelibuey, Blackbelly), com idades compreendidas entre 2 e 4 anos e com uma condição corporal entre 2 e 4 na escala 1-5. Os animais foram alimentados com alfafa, concentrado comercial e água *ad libitum*. Todos os procedimentos do presente estudo foram realizados de acordo com as técnicas de cuidado e saúde animal mexicanas (NOM-051-ZOO-1995) e com a aprovação do Comité de Ética e Bioética Institucional da UACJ (CIEB-2019-1-093).

Recolha de sémen e avaliação pré-cryopreservação

Cada garanhão foi trabalhado individualmente para a recolha de sémen, utilizando a técnica da vagina artificial. Uma vez recolhidas as amostras, estas foram mantidas num banho de água a 37,5 °C (Presicion Water 282, Thermo Scientific, EUA) enquanto as três amostras foram recolhidas e avaliadas. A recolha de sémen foi realizada duas vezes por semana durante seis semanas. Foram avaliados 12 ejaculados por ovelha, para um total de 36 ejaculados avaliados. A avaliação da pré-cryopreservação foi realizada através da recolha de 10 µL de cada amostra utilizando uma pipeta (Magnetic-Assist Pipette, Rainin, EUA), que foi depositada numa câmara de contagem padrão de 20 µm (Leja Chamber, Leja Products, Holanda), a ser avaliada por análise de sémen assistida por computador (CASA; AndroVision, Minitube, Alemanha) com um microscópio vertical (AxioScope.A1, Zeiss, Alemanha). Foi avaliada a motilidade progressiva (%) e a concentração de esperma (células/mL). Os níveis mínimos necessários para o congelamento foram estabelecidos como: volume de ejaculação ≥ 0,5 mL, mobilidade progressiva ≥ 80%, e uma concentração de 3×10^9 espermatozóides/mL (Câmara *et al.*, 2011).

Diluição e processamento do sémen

Os ejaculados eram processados individualmente, uma vez que eram utilizados para inseminação artificial. Foi realizado um protocolo de diluição utilizando um diluente comercial (Two Step; Continental Plastic Corp., EUA) com 6% de glicerol (v/v) e 10% de gema de ovo (v/v). A diluição foi feita a uma temperatura de 37 °C. A ejaculação obtida foi diluída a uma concentração de 120×10^6 espermatozóides móveis por mL. Uma vez



diluído, o sémen foi embalado em palhetas de 0,25 mL, com uma concentração de 30×10^6 espermatozóides móveis por palha, e armazenado a 5 °C durante duas horas. Uma vez as palhetas refrigeradas e equilibradas a 5 °C, foram colocadas numa arca de gelo a 5 cm do espelho de azoto durante 10 minutos, depois largadas em azoto e deixadas em pé durante 5 minutos. As palhetas foram então colocadas numa garrafa térmica criogénica para preservação; permaneceram aí até ao momento da análise e posteriormente para utilização em inseminação artificial por laparoscopia.

Tratamentos

As amostras diluídas foram fraccionadas em quatro porções semelhantes e foram realizados quatro tratamentos: tratamento de controlo, realizado da forma convencional; tratamento com quercetina (Q), adicionou-se quercetina 200 μ M (Q4951, Sigma Aldrich, EUA); tratamento com vitamina E (VE), adicionou-se vitamina E 100 μ M (47786, Sigma Aldrich, EUA); e tratamento com Q + VE, adicionou-se uma combinação de quercetina (200 μ M) e vitamina E (100 μ M).

Descongelamento de amostras de sémen

O descongelamento do sémen foi efectuado colocando cada palha num banho de água (Presicion Water 282, Thermo Scientific, EUA) a 37,5 °C durante 40 segundos. Para avaliar as características do sémen e a integridade do acrossoma, um total de seis palhetas por tratamento por ovelha (24 palhetas) foram seleccionadas aleatoriamente e descongeladas.

Avaliação das características do sémen pós-descongelamento

Para avaliar as características do sémen, 10 μ L de sémen foram colocados na câmara de contagem padrão para avaliar a motilidade (%), a motilidade progressiva (%) e a motilidade rápida (%), utilizando o sistema CASA. A tabela 1 mostra a configuração do sistema CASA utilizado para avaliar o sémen de ovelha.

Avaliação dos danos das membranas acrossómicas

10 μ L da amostra de sémen foi colhida e colocada num microtubo de 1 mL (Eppendorf, Alemanha) e misturada com 10 μ L de reagente azul-tripan (T8154, Sigma Chemical Co., EUA), e 10 μ L da mistura foi colocada numa lâmina para fazer um esfregaço. O esfregaço foi então fixado com etanol durante dois minutos, lavado com água destilada e deixado secar. Após a fixação ter sido completada, as lâminas foram colocadas num recipiente manchado com Giemsa (48900, Sigma Chemical Co., EUA) onde permaneceram durante 18-20 horas. Posteriormente, a lâmina foi enxaguada para remover o excesso de mancha com água destilada e deixada secar. A coloração das células espermáticas foi avaliada por microscopia ligeira a 100X (PrimoStar, Carl Zeiss, Alemanha). Para obter uma média



representativa de cada palha, foram feitos três esfregaços por palha, contando 100 espermatozóides por esfregaço. Os espermatozóides foram classificados em três tipos: espermatozóides vivos com acrossoma intacto (púrpura corada na região acrossômica), espermatozóides vivos com acrossoma danificado (sem acumulação de púrpura na região acrossômica) e espermatozóides mortos (citoplasma corado a azul).

Tabela 1. Configuração do sistema CASA* utilizado para avaliar o sêmen de ovelha

Variável	Configuração
Resolução horizontal/vertical	1024 pixels x 1024 pixels
Tamanho de pixel horizontal/vertical	5.5 μm x 5.5 μm
Quadros por segundo	Acima de 101 quadros por segundo
Área	10-100
Deteção da cauda cola	5 μm
Profundidade da câmara	20 μm
Relação pixel	0.54 μm
Volume de referência	
Largura	555.12 μm
Altura	555.12 μm
Espermatozóides in-motile	ALC < 20.00 $\mu\text{m s}^{-1}$ e FBC < 10.00 $\mu\text{m s}^{-1}$
Motilidade	
Motilidade local	VCL < 20.00 $\mu\text{m s}^{-1}$ e VLR < 10.00 $\mu\text{m s}^{-1}$
Motilidade progressiva	
Motilidade circular	Radio > 10.00 $\mu\text{m s}^{-1}$ a < 80.00 $\mu\text{m s}^{-1}$ e rotação > 0.70 $\mu\text{m s}^{-1}$
Motilidade lenta	VCL < 80.00 $\mu\text{m s}^{-1}$
Motilidade rápida	VCL < 80.00 $\mu\text{m s}^{-1}$

* Androvision, Minitube, Alemanha.

ALC, amplitude de deslocamento lateral da cabeça; FBC, frequência de batimento da cauda; VCL, velocidade curvilínea; VLR, velocidade em linha recta.

Inseminação artificial por laparoscopia e diagnóstico de gravidez

As ovelhas foram sincronizadas em cio utilizando esponjas intravaginais (Cronogest CR[®], Intervet International, Países Baixos) impregnadas com 40 mg de acetato de fluorogestone durante 12 dias. Após a remoção da esponja, 200 UI de gonadotropina coriônica equina (Novormon[®] 5000, Virbac, Argentina) foram aplicadas a cada ovelha. A detecção do estro foi realizada através da introdução de um garanhão preso com uma corda (sem deixar a fêmea montar) a uma caneta com as ovelhas previamente sincronizadas, 16 h antes da inseminação (Alhamada *et al.*, 2017). As fêmeas em cio foram inseminadas 55 h após a remoção da esponja pela técnica laparoscópica. Antes da inseminação, as palhas eram descongeladas numa garrafa térmica de descongelamento (Cito Products Incorporated, EUA) a 37,5 °C durante 40 segundos. O sêmen foi aplicado intra-uterino com a ajuda de um laparoscópio (250 W Halogen, Wolf, EUA) e um áspico (Aspic, IVM, França). A dose de inseminação (0,25 mL) foi igualmente distribuída em ambos os chifres uterinos. Foi inseminado um total de 201 ovelhas, distribuídas por tratamento da seguinte forma: controlo, 50 ovelhas; quercetina (Q), 52 ovelhas; vitamina E (VE), 50 ovelhas; e tratamento Q + VE, 49 ovelhas.



O diagnóstico da gravidez foi realizado por ultra-sons com um transdutor linear de 6,5 MHz (Kaixin, Xuzhou Kaixin Electronic Instrument CO., China), através do recto, 35 dias após a inseminação, independentemente do tratamento do extensor utilizado para a criopreservação do sémen. A fertilidade (taxa de gestação) foi determinada através da obtenção da percentagem de fêmeas que engravidaram do número total de fêmeas inseminadas por tratamento.

Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando a SAS 9.0 (Inst. Cary, NC, EUA). Os dados percentuais foram transformados em arcsina antes da análise estatística. A análise de variância foi realizada utilizando o procedimento do Modelo Linear Geral para as variáveis numéricas: motilidade, motilidade progressiva, motilidade rápida, e integridade do acrossoma. A comparação de meios entre tratamentos foi realizada utilizando o teste de Duncan. O teste do qui-quadrado foi utilizado para a taxa de gestação. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas em $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do efeito dos diferentes tratamentos sobre as características de mobilidade dos espermatozóides avaliados são apresentados na tabela 2. No estudo, nenhum tratamento apresentou diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) nas variáveis motilidade, motilidade progressiva e motilidade rápida. Contudo, numericamente, o tratamento com a maior percentagem de motilidade (71,57%) e de motilidade progressiva (68,13%) foi o tratamento com quercetina em comparação com os outros tratamentos. Contudo, na variável de motilidade rápida, o tratamento com maior percentagem (numericamente) foi o tratamento com vitamina E com 31,48 %.

Como mencionado, a criopreservação induz stress oxidativo como resultado do excesso de formação de ROS, que afecta a estrutura e características do esperma, causando danos no DNA, lípidos e proteínas que protegem a estrutura do esperma, uma vez que altera os sistemas enzimáticos e as vias de sinalização celular, o que pode levar à morte celular. Os danos de esperma causados por ROS ocorrem durante a criopreservação e descongelação, e mesmo durante o armazenamento em nitrogénio líquido. É importante mencionar que os espermatozóides normalmente geram pequenas quantidades de ROS que são importantes para diferentes processos fisiológicos dos espermatozóides, tais como a condensação, a hiperactivação e a fertilização de oócitos ([Mata-Campuzano et al., 2015](#); [Aitken, 2017](#)); contudo, uma vez que estes níveis fisiológicos excedem os mecanismos de controlo oxidativo, ocorre stress oxidativo ([El-Khawagah et al., 2020](#)). Portanto, para reduzir os danos causados pelos efeitos negativos das ROS, vários autores propuseram a suplementação de antioxidantes para meios de congelação, como



a vitamina E e a quercetina. Por exemplo, [Sarlós et al. \(2002\)](#), [Silva et al. \(2012\)](#), e [Abdi-Benemar et al. \(2015\)](#) avaliaram a adição de vitamina E aos meios de criopreservação do sêmen de ovelha, e relataram efeitos favoráveis sobre a integridade acrossômica, vitalidade e motilidade. No entanto, no presente estudo, não foi encontrado qualquer efeito favorável da adição de vitamina E como antioxidante sobre as variáveis de motilidade avaliadas. Estes efeitos contraditórios da adição de vitamina E podem dever-se a diferentes componentes dos diluentes, já que [Sarlós et al. \(2002\)](#) mencionam que o efeito da vitamina E varia em resposta ao açúcar e tampão utilizados nos diluentes; isto também poderia explicar por que razão no tratamento em que a vitamina E e a quercetina foram combinadas também não houve efeito favorável nas variáveis avaliadas. No presente estudo, o diluente utilizado contém frutose como fonte de energia e tris aminometano (TRIS) como tampão e [Sarlós et al. \(2002\)](#) indicam que a adição de vitamina E é mais eficaz quando os diluentes à base de sucrose contêm glicose e TRIS.

Tabela 2. Efeito da adição de quercetina e vitamina E nas características de motilidade espermática do sêmen de ovino criopreservado (Média ± desvio padrão)

Tratamento	Motilidade (%)	Motilidade progressiva (%)	Motilidade rápida (%)
Control	67.20±20.82 ^a	63.52±21.31 ^a	26.65±16.68 ^a
Q	71.57±6.40 ^a	68.13±6.57 ^a	27.31±8.22 ^a
Vit E	69.36±11.41 ^a	65.92±12.62 ^a	31.48±13.15 ^a
Q + Vit E	60.07±13.16 ^a	53.95±14.50 ^a	16.93±8.72 ^a

^aDiferentes literais entre linhas indicam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$); Q = 200 µM de quercetina; Vit E = 100 µM de vitamina E.; Q + Vit E = 200 µM de quercetina + 100 µM de vitamina E.

Da mesma forma, foi noticiado que a adição de quercetina a meios de criopreservação de sêmen de diferentes espécies produz efeitos favoráveis na motilidade e integridade acrossômica ([Gibb et al., 2013](#); [Seifi-Jamadi et al., 2016](#); [Seifi-Jamadi et al., 2017](#); [Ahmed et al., 2019](#); [El-Khawagah et al., 2020](#)), embora alguns autores não tenham relatado efeitos positivos da adição de quercetina ([Silva et al., 2012](#); [Banday et al., 2017](#)) ou mesmo relatado efeitos negativos ([Restrepo et al., 2016](#)). No presente estudo, embora a adição de quercetina não tenha mostrado uma diferença estatística nas variáveis de motilidade avaliadas, mostrou uma maior percentagem (numérica) em comparação com os outros tratamentos nas variáveis de motilidade e de motilidade progressiva. A ausência de um efeito estatisticamente diferente pode talvez dever-se aos excelentes resultados de motilidade obtidos após o descongelamento do sêmen em todos os tratamentos, uma vez que normalmente é relatada uma variação entre 30 a 50 % para a motilidade após o descongelamento ([Motlagh et al., 2014](#); [Abdi-Benemar et al., 2015](#); [Masoudi et al., 2017](#)), e no presente estudo em todos os tratamentos os valores de motilidade foram superiores a 60%.

Neste estudo, ao adicionar uma concentração de 200 µM de quercetina, obteve-se uma maior percentagem de motilidade e motilidade progressiva (numericamente) porque é um potente antioxidante que actua sobre os espermatozóides, inibindo os radicais livres, e



tem uma actividade de limpeza de ROS mais intensa do que a vitamina E (Stojanović *et al.*, 2001), previne a capacitação prematura do esperma antes da inseminação artificial e a reacção acrossómica durante o armazenamento, o que melhora a esperança de vida do esperma (Restrepo *et al.*, 2016; Seifi-Jamadi *et al.*, 2016). Consequentemente, El-Khawagah *et al.* (2020) relatam que a inclusão da quercetina reduz os níveis de H_2O_2 e a peroxidação lipídica, que são indicadores do seu efeito antioxidante. Além disso, o efeito positivo nas variáveis de motilidade pode estar relacionado com a interacção com Ca^{2+} -ATPase, uma enzima chave para a regulação da motilidade, uma vez que a quercetina tem um efeito inibidor sobre a bomba de Ca^{2+} -ATPase na membrana plasmática, resultando numa elevação dos níveis de Ca^{2+} , que desempenha um papel fundamental na produção de adenosina monofosfato cíclico (cAMP), factores que controlam a motilidade nos espermatozóides (El-Khawagah *et al.*, 2020).

À semelhança do que foi encontrado no presente estudo, Ardeshirnia *et al.* (2017) demonstraram que ao utilizar a quercetina no sémen de ovelha extraído da epidídima, ao descongelar os espermatozóides mostrou uma melhor viabilidade ao utilizar as concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ no extensor de sémen, mas a motilidade progressiva e a motilidade não foram afectadas em comparação com o tratamento de controlo (0 $\mu\text{g/mL}$). Por outro lado, Ahmed *et al.* (2019) utilizaram 150 e 200 μM de quercetina em sémen de búfalo criopreservado, e na avaliação pós-degelo, estes tratamentos foram melhores para a motilidade progressiva e integridade da membrana plasmática em comparação com os outros tratamentos (controlo, 50 e 100 μM de quercetina).

A tabela 3 mostra as percentagens de esperma vivo com acrossoma intacto (VAI), esperma vivo com acrossoma danificado (VAD) e esperma morto obtido nos diferentes tratamentos. O tratamento com quercetina mostrou uma diferença significativa em comparação com os outros tratamentos em espermatozóides VAI ($P < 0,05$). Com respeito aos espermatozóides VAD, foi encontrada uma diferença entre os tratamentos com vitamina E (100 μM) e quercetina (200 μM), em comparação com os tratamentos de controlo (convencional) e a combinação de vitamina E (100 μM) e quercetina (200 μM) ($P < 0,05$). O tratamento com quercetina (200 μM) mostrou uma diferença significativa, tendo menos espermatozóides mortos em comparação com os outros tratamentos ($P < 0,05$), indicando uma maior viabilidade.

Tabela 3. Efeito da adição de quercetina e vitamina E na vitalidade do esperma e danos do acrossoma no esperma ovino criopreservado (Média \pm desvio padrão)

Tratamento	Vivos Acrossoma Intacto (%)	Vivos Acrossoma Danificado (%)	Mortos (%)
Control	8.66 \pm 4.50 ^b	48.33 \pm 4.50 ^b	43.00 \pm 4.00 ^{bc}
Q	22.33 \pm 2.51 ^a	58.66 \pm 1.52 ^a	19.00 \pm 2.64 ^a
Vit E	10.66 \pm 2.08 ^b	52.00 \pm 5.29 ^a	38.33 \pm 6.08 ^b
Q + Vit E	11.33 \pm 2.08 ^b	41.33 \pm 3.21 ^b	47.33 \pm 1.52 ^c

^{a,b,c} Diferentes literais indicam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$); Q = 200 μM quercetina; Vit E = 100 μM vitamina E.; Q + Vit E = 200 μM quercetina + 100 μM vitamina E.



Estes resultados podem dever-se ao facto de, como acima mencionado, os antioxidantes terem um efeito protector, uma vez que as deficiências de motilidade e viabilidade do esperma ocorrem no momento da criopreservação, e isto deve-se aos danos causados por ROS (Karimfar *et al.*, 2015). Embora as ROS sejam produtos normais do metabolismo celular, quando estão presentes níveis elevados de ROS, as ROS são prejudiciais aos espermatozóides, e são geradas tanto na altura da criopreservação como do descongelamento, danificando a morfologia dos espermatozóides (Aitken, 2017), afectando lípidos e proteínas que protegem os espermatozóides, o que pode levar à morte celular (Ardeshimia *et al.*, 2017).

A este respeito, Ahmed *et al.* (2019), utilizando 150 e 200 μM de quercetina em sémen de búfalo criopreservado, descobriram que os espermatozóides apresentavam menos danos na integridade da membrana e danos acrossómicos em comparação com os outros tratamentos (controlo, 50 e 100 μM de quercetina). No presente estudo, concentrações semelhantes, 200 μM de quercetina, foram utilizadas no meio de criopreservação do sémen de ovelha e este tratamento mostrou uma diferença significativa para a variável VAI espermatozóides em comparação com os outros tratamentos. Isto indica um efeito protector da quercetina sobre a membrana acrossómica.

A integridade da membrana é importante para manter a viabilidade do esperma e é precisamente aqui que as principais lesões ocorrem no momento da criopreservação - o serpente, uma vez que a redução e o aumento da temperatura causam danos ultra-estruturais e funcionais. A integridade das membranas é um requisito fundamental para a viabilidade do esperma e uma fertilização bem sucedida (Martínez-Pastor *et al.*, 2004; El-Khawagah *et al.*, 2020). Os danos parciais ou totais no acrossoma espermático resultam numa incapacidade de fertilização, uma vez que as amostras de sémen com uma elevada proporção de acrossomas alterados ou ausentes tendem a ter uma baixa fertilidade. A utilização de quercetina no sémen reduz a peroxidação lipídica dos espermatozóides durante a congelação (El-Khawagah *et al.*, 2020) e evita a sua capacidade prematura antes da inseminação artificial (Restrepo *et al.*, 2016). Isto porque a presença e localização de substituições de hidroxil (-OH) e o anel B de catecol fazem da quercetina um antioxidante eficaz, uma vez que possui uma actividade de limpeza de ROS mais intensa do que a vitamina E (Stojanovic *et al.*, 2001).

Gibb *et al.* (2013) relatam que a quercetina a uma concentração de 150 μM em sémen equino criopreservado melhorou a motilidade do esperma ao descongelar, e também aumentou a percentagem de esperma com acrossoma intacto em comparação com tratamentos com 200 U/mL de catalase e 0,2 mg/mL de cisteína. Contudo, no estudo de Seifi-Jamadi *et al.* (2016), adicionando 100 μM de quercetina ao meio de criopreservação do esperma equino, obtiveram um melhor resultado na motilidade, mas não encontraram um efeito significativo na vitalidade e integridade da membrana.



Finalmente, o quadro 4 mostra os resultados de fertilidade (taxa de gestação) em ovelhas inseminadas por laparoscopia com o sêmen de ovelha criopreservado adicionado com os diferentes antioxidantes. Ao contrário das expectativas, porque o tratamento com quercetina melhorou a protecção acrossômica, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos ($P > 0,05$). No entanto, o tratamento que apresentou o resultado percentual mais elevado (numericamente) em comparação com os outros tratamentos na taxa de gestação foi o tratamento com quercetina 200 μM com 51,92% de fertilidade diagnosticada aos 35 dias de gestação.

Os danos celulares levam à desestabilização e mesmo à ruptura de membranas, e à perda de componentes intracelulares, por exemplo enzimas metabólicas e ATP, resultando na perda de viabilidade dos espermatozóides. A membrana desempenha um papel importante na viabilidade do esperma e na fertilização bem sucedida do oócito, por isso é importante que esteja intacta no momento do degelo (Martínez-Pastor *et al.*, 2004). Os danos na cromatina começam geralmente na região peri-acrossômica, as regiões basais do espermatozóide, e posteriormente expandem-se para outras regiões do núcleo durante a criopreservação (Sousa *et al.*, 2016), afectando significativamente o estado acrossômico ou mesmo a vitalidade do espermatozóide, levando a uma incapacidade de fertilização. A baixa fertilidade relatada na inseminação artificial quando se utiliza sêmen criopreservado pode ser devida aos danos causados aos espermatozóides durante o processo de criopreservação-degelo (Sousa *et al.*, 2016). Por conseguinte, foi proposta a adição de antioxidantes no sêmen para evitar danos no esperma e melhorar a fertilidade do sêmen na inseminação artificial.

A quercetina é um antioxidante que actua sobre a membrana, mitocôndria e acrossoma de espermatozóides para os proteger durante a queda de temperatura durante a criopreservação (Seifi-Jamadi *et al.*, 2016). Num estudo de McNiven & Richardson (2006), descobriram que a inclusão de 50-300 μM de quercetina na criopreservação do sêmen equino reduziu significativamente a percentagem de espermatozóides que sofreram condensação e reacção acrossômica aquando do descongelamento.

Tabela 4. Efeito da adição de quercetina e vitamina E em sêmen de ovelha criopreservado na taxa de gestação em ovelhas inseminadas por inseminação artificial laparoscópica

Tratamento	Taxa de gestação (%)
Control	23/50 (46.00%) ^a
Q	27/52 (51.92%) ^a
Vit E	17/50 (34.00%) ^a
Q + Vit E	21/49 (42.82%) ^a

^a Diferentes literais indicam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$); Q = 200 μM de quercetina; Vit E = 100 μM de vitamina E.; Q + Vit E = 200 μM de quercetina + 100 μM de vitamina E.



Ardeshirnia et al. (2017) relatam o aumento da fertilidade *in vitro* do sêmen de ovelha colhido de epidídimo e criopreservado com a adição de quercetina em concentrações de 5 e 10 µg/mL em comparação com os outros tratamentos (0, 15, 20 e 50 µg/mL). Nestas concentrações de quercetina, o número de embriões na fase de zigoto, mórula e blastocisto aumentou. No estudo realizado por *Ahmed et al. (2019)*, ao adicionar quercetina a concentrações de 150 e 200 µM, em sêmen de búfalo criopreservado, a fertilidade *in vivo* foi mais elevada (61,82 e 65,22 %, respectivamente) em comparação com o tratamento de controlo (sem qualquer aditivo; 46,90 %). No presente estudo, o aumento numérico da taxa de fertilidade observado no tratamento com quercetina pode talvez estar relacionado com o aumento da vitalidade e protecção do acrossoma, uma vez que esta concentração de quercetina mostrou uma diferença significativa nos espermatozóides VAI em comparação com os outros tratamentos, indicando que a fertilidade do sêmen criopreservado poderia ser aumentada pela adição de antioxidantes como a quercetina no extensor, uma vez que a qualidade do sêmen pós-descongelamento é um dos factores mais importantes que influenciam a probabilidade de gestação após a inseminação, (*Ahmed et al., 2019*). No entanto, são necessários mais estudos onde diferentes concentrações de quercetina são avaliadas e a avaliação *in vivo* da fertilidade é realizada com um maior número de ovelhas.

CONCLUSÕES

A adição de 200 µM de quercetina ao sêmen de ovino criopreservado aumentou a percentagem de esperma vivo com acrossoma intacto e de esperma vivo com acrossoma danificado, o que implica uma redução na percentagem de esperma morto em comparação com os outros tratamentos, indicando que cumpriu as suas funções antioxidantes ao proteger o esperma dos danos da criopreservação; contudo, isto não resultou num aumento da taxa de gestação. Recomenda-se a realização de mais estudos com diferentes concentrações de quercetina e o aumento dos estudos com antioxidantes em testes *in vivo*.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o apoio prestado pelo Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia através do projecto INFR201501- 251729 e à Universidade Autónoma de Ciudad Juárez através do projecto UACJ- PIVA 312-17-15.

LITERATURA CITADA

ABDI-BENEMAR H, Jafaroghli M, Khalili B, Zamiri MJ, Ezazi H, Shadparvar AA. 2015. Effects of DHA supplementation of the extender containing egg yolk and α- tocopherol on the freezability and post-thawing fertility of ram semen. *Small Ruminant Research*. 130:166–170. ISSN: 0921-4488. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.06.013>



AHMED H, Jahan S, Salman MM, Ullah F. 2019. Stimulating effects of Quercetin (QUE) in tris citric acid extender on post thaw quality and *in vivo* fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Theriogenology*. 134:18-23. ISSN: 0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.012>

AITKEN RJ. 2017. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Molecular Reproduction and Development*. 84:1039-1052. ISSN: 1098-2795. <https://doi.org/10.1002/mrd.22871>

ALLAI L, Anass B, Da silva M, Nasser B, El-Amari B. 2018. Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. *Animal Reproduction Science*. 192:6-17. ISSN: 0378-4320. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.019>

ALHAMADA M, Debus N, Lurette A, Bocquier F. 2017. Automatic oestrus detection system enables monitoring of sexual behaviour in sheep. *Small Ruminant Research*. 149:105–111. ISSN: 0921-4488. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.02.003>

ARDESHIRNIA R, Zandi M, Sanjabi MR. 2017. The effect of quercetin on fertility of frozen-thawed ram epididymal spermatozoa. *South African Journal of Animal Science*. 47:237-244. ISSN: 2221-4062. <http://dx.doi.org/10.4314/sajas.v47i2.16>

BANDAY MN, Lone FA, Rasool F, Rashid M, Shiraki A. 2017. Use of antioxidants reduce lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its cryopreservation. *Cryobiology*. 74:25-30. ISSN: 0011-2240. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.12.008>

BENHENIA K, Lamara A, Fatmi S, Iguer-Ouada M. 2016. Effect of cyclodextrins, cholesterol and vitamin E and their complexation on cryopreserved epididymal ram semen. *Small Ruminant Research*. 141:29–35. ISSN: 0921-4488. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.06.009>

BERKOVICH L, Earon G, Ron I, Rimmon A, Vexler A, Lev-Ari S. 2013. *Moringa oleifera* aqueous leaf extract down-regulates nuclear factor- κ B and increases cytotoxic effect of chemotherapy in pancreatic cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 13:212-218. ISSN: 2662-7671. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-212>

CÂMARA DR, Silva SV, Almeida FC, Nunes JF, Guerra MMP. 2011. Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. *Theriogenology*. 76:342–350. ISSN: 0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.013>



EL-KHAWAGAH ARM, Kandiel MMM, Samir H. 2020. Effect of quercetin supplementation in extender on sperm kinematics, extracellular enzymes release, and oxidative stress of egyptian buffalo bulls frozen–thawed semen. *Frontiers in Veterinary Science*. 7:604460. ISSN: 2297-1769. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.604460>

GIBB Z, Butler T, Morris L, Maxwell W, Grupen C. 2013. Quercetin improves the post thaw characteristics of cryopreserved sex-sorted and non-sorted stallion sperm. *Theriogenology*. 79:1001-1009. ISSN: 0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.06.032>

KARIMFAR MH, Niazvand F, Haghani K, Ghafourian S, Shirazi R, Bakhtiyari S. 2015. The protective effects of melatonin against cryopreservation-induced oxidative stress in human sperm. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 28:69-76. ISSN: 2058-7384. <https://doi.org/10.1177/0394632015572080>

MARTINEZ–PASTOR F, Johannisson A, Gil J, Kaabi M, Anel L, Paz P, Rodriguez–Martinez H. 2004. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC–1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen–thawed ram semen. *Animal Reproduction Science*. 84:121-133. ISSN: 0378-4320. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.12.006>

MASOUDI R, Shahnen AZ, Towhidi A, Kohram H, Akbarisharif A, Sharafi M. 2017. Fertility response of artificial insemination methods in sheep with fresh and frozen-thawed semen. *Cryobiology*. 74:77-80. ISSN: 0011-2240. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.11.012>

MATA-CAMPUZANO M, Álvarez-Rodríguez M, Álvarez M, Tamayo-Canul J, Anel L, de Paz P, Martínez-Pastor F. 2015. Post-thawing quality and incubation resilience of cryopreserved ram spermatozoa are affected by antioxidant supplementation and choice of extender. *Theriogenology*. 83:520-528. ISSN: 0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.10.018>

MCNIVEN M, Richardson G. 2006. Effect of quercetin on capacitation status and lipid peroxidation of stallion spermatozoa. *Cell Preservation Technology*. 4:169-177. ISSN: 1557-8119. <https://doi.org/10.1089/cpt.2006.4.169>

MOTLAGH MK, Sharafi M, Zhandi M, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Skakeri M, Soleimani M, Zeinoaldini S. 2014. Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in soybean lecithin-based semen extender following freeze-thawing process of ram sperm. *Cryobiology*. 69:217-22. ISSN: 0011-2240. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.07.007>



RESTREPO G, Montoya JD, Rojano B. 2016. Antioxidant capacity and post-thaw quality of stallion semen cryopreserved with quercetin and ergothioneine. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*. 63:167-178. ISSN 0120-2952. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v63n3.62747>

SARLÓS P, Molnár A, Kókai M, Gábor GY, Rátky J. 2002. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Veterinaria Hungarica*. 50:235–245. ISSN: 1588-2705. <https://doi.org/10.1556/avet.50.2002.2.13>

SEIFI-JAMADI A, Kohram H, Shahneh AZ, Ansari M, Macías-García B. 2016. Quercetin ameliorate motility in frozen-thawed turkmen stallions sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*. 45:73–77. ISSN: 0737-0806. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.06.078>

SEIFI-JAMADI A, Ahmad E, Ansari M, Kohram H. 2017. Antioxidant effect of quercetin in an extender containing DMA or glycerol on freezing capacity of goat semen. *Cryobiology*. 75:15-20. ISSN: 0011-2240. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.03.002>

SILVA E, Cajueiro J, Silva S, Soares P, Guerra M. 2012. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on *in vitro* evaluation of frozen ram sperm. *Theriogenology*. 77:1722-1726. ISSN: 0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.11.023>

SOUSA PC, Santos EAA, Silva AM, Bezerra JAB, Souza ALP, Lima GL, Oliveira MF, Silva AR. 2016. Identification of ultrastructural and functional damages in sperm from six-banded armadillos (*Euphractus sexcinctus*) due to cryopreservation. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 36:767-774. ISSN: 1678-5150. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000800015>

STOJANOVIĆ S, Sprinz H, Brede O. 2001. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 391:79–89. ISSN: 0003-9861. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2388>