



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

PAPEL DA QUERCETINA E DO OZÔNIO NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE BOVINOS

Willian Vaniel Alves dos Reis

CAMPO GRANDE, MS

2020



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

PAPEL DA QUERCETINA E DO OZÔNIO NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE BOVINOS

Willian Vaniel Alves dos Reis

Orientador: Prof. Dr. Breno Fernandes Barreto Sampaio

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Produção Animal.

CAMPO GRANDE, MS

2020



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Certificado de aprovação

Willian Vaniel Alves dos Reis

Papel da quercetina e do ozônio na criopreservação de sêmen de bovinos

Role of quercetin and ozone in the cryopreservation of bovine semen

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul, como requisito à obtenção do
título de Mestre em Ciência Animal.

Aprovado(a) em: 17-02-2020

BANCA EXAMINADORA:


Dr. Breno Fernandes Barreto Sampaio
Orientador (UFMS)


Dr. Gustavo Guerino Macedo
(UFMS)


Dra. Thyara de Decco Souza e Araujo
(UFMS)

*Dedico este trabalho aos meus pais, irmãs,
avós, namorada e todos os amigos que sempre
estiveram ao meu lado, me apoiando e
incentivando a correr atrás dos meus objetivos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por se fazer sempre presente em minha vida, me dando forças, sabedoria e saúde para que eu conseguisse vencer todas as dificuldades. Obrigado Senhor por permitir eu chegar até aqui, por ter sempre me acompanhado durante essa jornada de minha vida.

Agradeço também de maneira muito especial aos meus pais, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e aconselhando em todas as minhas decisões, mostrando qual é o melhor caminho a ser seguido, fazendo ser a pessoa que hoje sou e estar onde estou. Em nome deles estendo meu agradecimento a toda minha família, pelo carinho incondicional que tive e a educação. Vosso cuidado e dedicação me deram, em alguns momentos, a esperança para seguir.

Agradeço às minhas irmãs, Aline e Alice, pelo carinho, pelas brigas, sorrisos. Tudo isso também me fez crescer. Obrigado irmãs.

Não poderia deixar de agradecer à pessoa que me incentiva todos os dias a perseverar nos meus objetivos, me dando forças para seguir em frente, sendo meu conforto nas horas difíceis e me fazendo perceber que tudo vai valer a pena. A você, Cibele Tavares, minha namorada, vai esse agradecimento. Sou eternamente grato por tanto carinho, amor e tempo. Que Deus nos abençoe. Te amo!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Breno Fernandes Barreto Sampaio, por todos os ensinamentos, orientações e amizade nesses tempos. Estendo também os agradecimentos aos professores que atuaram como co-orientadores nessa trajetória: Prof.^a Dr.^a. Eliane Vianna da Costa e Silva e Prof. Dr. Gustavo Guerino Macedo, muito obrigado. Vossos conselhos foram fundamentais.

Agradeço a esta universidade, com seus docentes e demais servidores, pelo ambiente e pelo ensino de ótima qualidade que oferecem aos seus alunos. Obrigado por contribuírem com meu aprendizado e me incentivarem a sempre buscar mais.

Por fim, agradeço ao mundo, por fazer com que as coisas estejam em constante mudança, pois se não fosse assim, não teríamos o que pesquisar, o que descobrir, e o que fazer.

*“A ciência nunca resolve um problema
sem criar pelo menos outros dez. ”*

George Bernard Shaw

Resumo

REIS, W.V.A. Papel da quercetina e o ozônio na criopreservação de sêmen de bovinos. 2020. 66 f. Dissertação – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.

O presente experimento avaliou o efeito da Quercetina e do Ozônio ao diluente de congelação, visando a redução das crioinjúrias causadas ao sêmen de bovinos. Quinze ejaculados foram coletados de três touros jovens da raça Nelore e submetidos ao congelamento em 7 grupos experimentais: grupo C (CONTROLE), grupo O15 (15 µg/ml de ozônio), grupo O30 (30 µg/ml de ozônio), grupo O60 (60 µg/ml de ozônio), grupo Q25 (25 µg/ml de quercetina), grupo Q50 (50 µg/ml de quercetina) e grupo Q100 (100 µg/ml de quercetina). As amostras foram avaliadas pós-descongelamento (M-0) e pós-TTR (M-30) via sistema computadorizado de análise de sêmen e citometria de fluxo, sobre parâmetros de cinética espermática e viabilidade da estrutura celular (MT, MP, VCL, LIN, ALH, integridade de membrana plasmática, integridade acrossomal, potencial mitocondrial, fluidez de membrana e peroxidação lipídica). Quando comparada ao grupo CONTROLE, não verificou-se melhoria nas variáveis de cinética analisadas ($p>0.05$) como efeito da suplementação com quercetina. No entanto, a quercetina também não promoveu indícios de hiperativação nas amostras, mostrando que sua utilização não foi deletéria à estrutura da célula espermática. Por outro lado, o O_3 reduziu os valores para as mesmas variáveis tanto em M0 quanto em M30 ($p<0.05$), mostrando que nessas concentrações o seu poder oxidante tenha prevalecido, provavelmente porque as concentrações utilizadas não foram suficientemente baixas para que o ozônio expressasse seu fator pró-antioxidante, ou seja, sua capacidade de estimular a produção de antioxidantes. Mesmo não tendo expressado para cinética o efeito paradoxal do ozônio como indutor da produção de

antioxidantes, foi demonstrado pelas análises realizadas via citometria de fluxo que a diminuição dos parâmetros de cinética espermática tanto em M0 quanto em M30 não se reverteu em danos estruturais à célula ($p>0.05$), e que embora em M-30 o grupo controle tenha sido superior na variável PI-MST+ ($p<0.05$), os resultados de comparação com o grupo controle não indicaram diferença ($p>0.05$) para os demais parâmetros testados pela citometria de fluxo. Esse resultado nos instiga a pensar no efeito do ozônio caso a dosagem fosse menor, já que para cinética os valores pioraram com o aumento da dose e para estrutura não houve tamanho prejuízo. Conclui-se que a quercetina nas concentrações utilizadas não promove ganhos significativos ao sêmen congelado, bem como também não demonstrou citotoxicidade. No entanto, o ozônio nas concentrações adotadas não melhora os parâmetros de cinética espermática, não sendo observado seu efeito paradoxal como antioxidante para essas características, porém o fato de que o gás não prejudicou a estrutura da célula espermática abre vertentes para testes com dosagens menores.

Palavras-chave: espermatozóide; espécies reativas de oxigênio; peroxidação lipídica.

Abstract

REIS, W.V.A. Role of quercetin and ozone in the cryopreservation of bovine semen. 2020. 66 f. Dissertation - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.

The present experiment evaluated the effect of Quercetin and Ozone on the freezing diluent, aiming to reduce the cryoinjury caused to bovine semen. Fifteen ejaculates were collected from three young Nelore bulls and subjected to freezing in 7 experimental groups: group C (CONTROL), group O15 (15 μg / ml of ozone), group O30 (30 μg / ml of ozone), group O60 (60 μg / ml of ozone), group Q25 (25 μg / ml of quercetin), group Q50 (50 μg / ml of quercetin) and group Q100 (100 μg / ml of quercetin). The samples were evaluated post-thaw (M0) and post-TTR (M30) via a computerized semen analysis system and flow cytometry, on parameters of sperm kinetics and cell structure viability (MT, MP, VCL, LIN, ALH, plasma membrane integrity, acrosomal integrity, mitochondrial potential, membrane fluidity and lipid peroxidation). When compared to the CONTROL group, there was no improvement in the analyzed kinetic variables ($p > 0.05$) as an effect of quercetin supplementation. However, quercetin also did not promote evidence of hyperactivation in the samples, showing that its use was not harmful to the structure of the sperm cell. On the other hand, O3 reduced the values for the same variables in both M-0 and M-30 ($p < 0.05$), showing that in these concentrations its oxidizing power has prevailed, probably because the concentrations used were not low enough to that ozone expresses its pro-antioxidant factor, that is, its ability to stimulate the production of antioxidants. Even though the paradoxical effect of ozone as an inducer of antioxidant production was not expressed for kinetics, it was demonstrated by the analyzes carried out via flow cytometry that the decrease in sperm kinetics parameters in both M0 and M30 did not result in structural damage to the cell ($p > 0.05$), and although in M-30 the control group was superior in the variable PI-MST + ($p < 0.05$), the results of comparison with the control group did not indicate difference ($p > 0.05$) for the other tested parameters by flow cytometry. This result encourages us to think about the effect of ozone if the dosage was lower, since for kinetics the values worsened with increasing dose and for structure there was no such damage. It is concluded that quercetin in the concentrations used does not promote significant gains to frozen semen, nor did it demonstrate cytotoxicity. However, ozone in the adopted

concentrations does not improve the parameters of sperm kinetics, and its paradoxical effect as an antioxidant for these characteristics is not observed, however the fact that the gas did not harm the structure of the sperm cell opens the way for tests with lower dosages.

Keywords: Spermatozoa; reactive oxygen species; lipid peroxidation

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Delineamento experimental (Coleta e criopreservação das amostras) para análise dos efeitos da quercetina e do ozônio na criopreservação de sêmen bovino.
.....58
- Figura 2 Médias para grupo controle e tratamentos com ozônio, sob as variáveis MT e MP (%) no momento pós-descongelamento (M0). O15 -15 µg/ml de ozônio; O30 - 30 µg/ml de ozônio; O60 - 60 µg/ml de ozônio.....59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Sondas Fluorescentes utilizadas para avaliação de viabilidade estrutural celular via citometria de fluxo, com suas respectivas interpretações.55

Tabela 2 Resultados da avaliação de cinética espermática e integridade da estrutura celular para o tratamento controle e os tratamentos com quercetina nos momentos pós-descongelamento (M0) e pós-TTR (M30)56

Tabela 3 Resultados da avaliação de cinética espermática e integridade da estrutura celular para o tratamento controle e os tratamentos com ozônio nos momentos pós-descongelamento (M0) e pós-TTR (M30).....57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	14
2	HIPÓTESE	16
3	CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	Espécies Reativas de Oxigênio	16
3.1.1	Principais EROs.....	17
3.2	Antioxidantes.....	17
3.2.1	Principais antioxidantes	18
3.3	Quercetina.....	19
3.4	Ozônio.....	20
3.4.1	Geração de Ozônio.....	20
3.5	Análise Computadorizada do Movimento Espermático	21
3.6	Citometria de Fluxo.....	22
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
4	CAPÍTULO 2 – PAPEL DA QUERCETINA E DO OZÔNIO NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE BOVINOS (Redigido conforme as normas da revista Animal Science Journal)	33
	Introdução	36
	Material e métodos.....	38
	Resultados e discussão.....	41
	Conclusões	45
	Agradecimentos.....	45
	Referências	45
	TABELAS	55
	FIGURAS	58
	ANEXO I – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).....	60
	ANEXO II – Normas para submissão de artigo	61

1 INTRODUÇÃO GERAL

Como resultado do sucesso do país com relação ao setor da pecuária de corte e em meio ao apelo pelo aumento da produtividade, a jornada por biotécnicas cada vez mais eficazes tem favorecido a utilização de sêmen criopreservado (ABIEC, 2019; CHACUR et al., 2012). Tal prestígio resultou na comercialização de 18.886.557 doses de sêmen em 2019, o que significa um crescimento de 18,8% quando comparado com o ano anterior (BARUSELLI, 2020). No entanto, o processo de criopreservação resulta em considerável proporção de espermatozoides que não resistem aos efeitos deletérios do processo, o que pode comprometer o objetivo final, que é a fecundação do oócito (LEITE et al., 2011).

Quando comparado ao sêmen fresco, o sêmen congelado apresenta cerca de 50% de queda de viabilidade espermática, em decorrência dos efeitos osmóticos e térmicos que modificam a estrutura da membrana plasmática, bem como sua fluidez, permeabilidade e composição lipídica (CHACUR et al., 2012). A implicação disso é que o número total de espermatozoides funcionais em uma dose pode cair abaixo do número necessário para alcançar a fertilização, comprometendo a fertilidade (WATSON, 2000).

Todo o estresse térmico causado pela criopreservação provoca uma modificação no metabolismo energético da célula. Assim, ocorre um estresse oxidativo, não somente em decorrência da retirada de grande parte do plasma seminal e sua função antioxidante (BUSTAMANTE-FILHO; PEDERZOLLI; SGARAVATTI, 2006), como também pelo aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs), que são relacionadas principalmente com a redução da motilidade espermática (RUIZ-PESINI et al., 1998).

Entende-se por espécies reativas de oxigênio todos os radicais e não radicais derivados do oxigênio, que por serem eletronicamente instáveis, se tornam altamente reativos, tendo a capacidade de reagir com um grande número de compostos que estejam próximos (AGARWAL; GUPTA, 2005). Em uma condição que seja considerada fisiológica, as EROs são encontradas em equilíbrio com os antioxidantes e participam de processos vitais dos espermatozoides como maturação, capacitação e hiperativação espermática,

reação acrossomal e fusão espermio-oocitária, porém, se tornam prejudiciais às células espermáticas quando esse equilíbrio é quebrado (SAALU, 2010).

Naturalmente, o ejaculado bovino é composto por alguns antioxidantes que atuam na neutralização das EROs, como as enzimas Superóxido Dismutase, Catalase e Glutathione Peroxidase, Cisteína, Vitamina A e Vitamina E (BOLLWEIN; BITTNER, 2018; PATEL et al., 2016; TVRDÁ et al., 2013). Entretanto, em decorrência do processo de diluição do sêmen para a criopreservação, há uma redução na disponibilidade desses antioxidantes, o que pode culminar no aumento da produção de EROs (ANDRADE; SENEDA; ALFIERI, 2010; DUQUE C; ROJANO; RESTREPO B, 2017; MAIA; BICUDO, 2009). Por esse motivo, tem se estudado o efeito da suplementação de antioxidantes aos meios de diluição para preparo, manutenção e criopreservação espermática, a fim de reduzir os efeitos causados por esse possível desequilíbrio (MORTIMER, 2000a).

Os flavonóides são polifenóis, altamente antioxidantes, derivados de plantas, com sua capacidade antioxidante proposta por serem doadores de elétrons, conferindo um papel de neutralização dos radicais livres (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). Um exemplo dessa classe de antioxidantes é a quercetina, encontrada em grande quantidade em frutas e verduras, e vem sendo estudado devido sua alta capacidade de sequestro e neutralização de radicais livres, em decorrência do número de grupos hidroxila pertencentes à sua estrutura (BEHLING et al., 2004).

O ozônio é um gás formado por 3 átomos de oxigênio, presente em abundância na estratosfera e conhecido por ser um poderoso oxidante (SUNNEN, 1988) Tem sido explorado um efeito paradoxal do gás ozônio (O_3), na perspectiva de que seu poder oxidante induza um leve estresse oxidativo, promovendo a elevação dos antioxidantes enzimáticos (ALVES et al., 2004)al, dessa maneira, causando um bloqueamento da geração de radicais livres (AGRILLO et al., 2006).

Diante disso, foi avaliado o efeito da suplementação de quercetina e ozônio ao diluente de congelação, sobre os parâmetros de cinética espermática, integridade de membrana plasmática e do acrossoma, capacitação espermática, atividade mitocondrial e susceptibilidade à lipoperoxidação no sêmen bovino.

2 HIPÓTESE

A suplementação do diluente para criopreservação de sêmen bovino com Quercetina ou Ozônio promove melhorias na qualidade seminal, com relação à cinética e estrutura espermática.

3 CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Espécies Reativas de Oxigênio

É possível definir um radical livre como qualquer espécie que contém um ou mais elétrons desemparelhados, e quando esses radicais livres são oriundos de reações com o oxigênio (O_2), são denominadas espécies reativas de oxigênio (ERO; TURRENS, 2003).

Em uma condição que seja considerada fisiológica, as EROs são encontradas em equilíbrio com os antioxidantes e participam de processos vitais dos espermatozoides como maturação, capacitação e hiperativação espermática, reação acrossomal e fusão espermo-oocitária (SAALU, 2010). Entretanto, os antioxidantes estão presentes em quantidade limitada e um desequilíbrio resultante do excesso de formação de ERO pode resultar em processos deletérios à célula espermática.

Esse fenômeno é denominado estresse oxidativo (DRÖGE, 2002). O resultado disso é revertido principalmente na redução da motilidade espermática (RUIZ-PESINI et al., 1998). A relação entre o aumento de EROs e a diminuição da motilidade espermática pode ser devida a uma série de eventos que culminam na diminuição da fosforilação da proteína axonemal, causando a imobilização dos espermatozoides (AGARWAL; SALEH; BEDAIWY, 2003).

O principal local de produção de EROs é na mitocôndria, durante os processos de produção de energia por meio da fosforilação oxidativa (BARJA, 2007). Além disso, quando um espermatozóide morre, uma enzima chamada aminoácido oxidase é liberada, promovendo a desaminação oxidativa dos aminoácidos triptofano, fenilalanina e tirosina, produzindo como consequência uma ERO extremamente deletéria chamada peróxido de hidrogênio (MACMILLAN; TIKU; HART, 1972; TOSIC; WALTON, 1950).

3.1.1 Principais EROs

- **Radical Superóxido (O_2^-):** Gerado principalmente durante a cadeia respiratória mitocondrial e precursor da maioria das EROs, o radical superóxido tem sua origem a partir da incorporação de um elétron livre ao oxigênio. É produzido em condições normais pelas mitocôndrias, porém, o aumento na sua produção pode ocorrer em ocasiões como em caso de hipóxia tecidual (LENZI et al., 2000). É uma ERO pouco reativa por não ter a capacidade de atravessar membranas lipídicas, ficando na matriz mitocondrial, porém é precursor para formação do peróxido de hidrogênio (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

- **Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2):** Quando o O_2^- recebe um elétron que é doado por outro O_2^- e se associa com dois H^+ , se forma o H_2O_2 , que mesmo não sendo considerado um radical livre, é extremamente deletério por sua capacidade de atravessar as membranas biológicas e participar das reações que produzem o radical hidroxila. Essa reação pode ocorrer por intermédio da enzima Superóxido Dismutase (SOD), pela enzima aminoácido oxidase ou ocorrer sem nenhuma interferência (MACMILLAN; TIKU; HART, 1972; NORDBERG; ARNÉR, 2001; TOSIC; WALTON, 1950; TURRENS, 2003).

- **Radical Hidroxila ($OH^\cdot$):** Conhecido por ser um dos radicais livres mais reativos, o radical hidroxila tem sua formação a partir de uma reação do H_2O_2 com o ferro ou cobre, processo denominado reação de Fenton (GRIVEAU; LE LANNOU, 1997). A ação desse radical se dá na membrana celular, ocasionando o processo de peroxidação lipídica, que é a oxidação e degradação dos ácidos graxos poli-insaturados (ANDRADE; SENEDA; ALFIERI, 2010).

3.2 Antioxidantes

Os antioxidantes são compostos que atuam em substratos oxidáveis atrasando ou evitando tal oxidação (DRÖGE, 2002). Nas células espermáticas, esses compostos agem impedindo a produção de ERO ou interrompendo a reação em cadeia que ocorre durante o processo de peroxidação lipídica (LENZI et al., 2000), podendo ser classificados como enzimáticos se a função antioxidante é desempenhada por uma enzima e não-enzimáticos se a função antioxidante não for desempenhada por enzima, sendo essa segunda classe principalmente advinda de origem dietética (BARBOSA et al., 2010).

Os principais antioxidantes enzimáticos envolvidos na detoxificação das espécies reativas de oxigênio no sêmen bovino são as enzimas catalase, a glutationa-peroxidase e a superóxido dismutase (BILODEAU et al., 2000), enquanto a vitamina C, vitamina E e os compostos fenólicos são exemplos de antioxidantes não-enzimáticos presentes (MAKKER; AGARWAL; SHARMA, 2009). Além disso, pequenas moléculas como a glutationa são importantes antioxidantes ou cofatores para o metabolismo das espécies reativas de oxigênio (MEISTER, 1994).

3.2.1 Principais antioxidantes

- ENZIMÁTICOS:

- **Catalase (CAT):** Normalmente encontrada nos peroxissomos, a enzima CAT age tanto isoladamente, convertendo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em H_2O e O_2 , quanto em conjunto com a enzima superóxido dismutase (SOD), promovendo a conversão do radical superóxido (O_2^-) em água (SILVA; GUERRA, 2011).

- **Superóxido dismutase (SOD):** Presente tanto na célula espermática quanto no plasma seminal, a SOD utiliza a reação de dismutação para promover a conversão de duas moléculas de O_2^- em H_2O_2 e O_2 (MCCORD; FRIDOVICH, 1988; NORDBERG; ARNÉR, 2001).

- **Glutathione peroxidase (GPx):** A GPx, assim como a CAT, exerce seu papel antioxidante sobre o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O resultado da doação de H^+ e elétrons de duas moléculas de glutathione reduzida é a formação de duas moléculas de H_2O e uma de glutathione oxidada (SILVA; GUERRA, 2011; TURRENS, 2003).

- NÃO-ENZIMÁTICOS:

- **Vitamina C:** Também conhecida como ácido ascórbico ou ascorbato, a vitamina C atua como um agente redutor, através da doação de elétrons e íons H^+ , processo esse que torna inofensivas as EROs (NORDBERG; ARNÉR, 2001). Além disso, quando associada com a vitamina E, é capaz de reprimir a peroxidação lipídica (BIANCHI; ANTUNES, 1989).

- **Vitamina E:** A vitamina E é um componente dos óleos vegetais. É possível encontrá-la em quatro formas diferentes na natureza: α , β , γ e δ -tocoferol, sendo o α -tocoferol a forma antioxidante mais abundante. Sua

propriedade antioxidante é direcionada para a característica de que impede a propagação das reações em cadeia, que são induzidas pelos radicais livres nas membranas (BIANCHI; ANTUNES, 1989).

- **Compostos fenólicos:** Os compostos fenólicos são substâncias originadas do metabolismo secundário das plantas, quimicamente definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais grupamentos hidroxila (OH), que são os responsáveis pelo seu potencial antioxidante (ANGELO; JORGE, 2007). Assim, quanto maior a quantidade de grupamentos OH em sua estrutura, maior a capacidade antioxidante desse composto, pois este possuirá maior disponibilidade de H^+ para doar e neutralizar ou sequestrar as EROs (SILVA et al., 2010). Nesse grupamento de antioxidantes é possível destacar os flavonoides, que atuam como antioxidantes na inativação dos radicais livres em ambos os compartimentos celulares: lipofílico e hidrofílico. Entre eles, um dos mais estudados é a quercetina (BIANCHI; ANTUNES, 1989).

3.3 Quercetina

Encontrada em grandes quantidades nas frutas, verduras e chás (SIMÕES et al., 2013; YUTING et al., 1990) e em virtude da grande quantidade de grupos hidroxila em sua estrutura, o polifenol quercetina apresenta-se como um potente antioxidante natural (SILVA et al., 2012).

O flavonóide quercetina é capaz de reduzir consideravelmente as concentrações de O_2^- (YUTING et al., 1990). Além disso, possui a capacidade de reagir diretamente com o $OH^\cdot$, doando elétrons e H^+ para este radical, resultando na formação de H_2O . A quercetina também é conhecida por sua propriedade estabilizadora do ferro, inteferindo dessa maneira na reação de Fenton e dificultando a formação do radical hidroxila (BEHLING et al., 2004).

Em sùmula, a ação da quercetina pode ser descrita como estabilizadora dos radicais superóxido (O_2^-) ou radical hidroxila ($OH^\cdot$; SILVA et al., 2016) e sua utilização na manutenção da viabilidade espermática tem sido adotada com sucesso em várias espécies como equinos (GIBB et al., 2013; MCNIVEN; RICHARDSON, 2006), caprinos (SILVA et al., 2016), bovinos (TIRONI et al., 2019), bubalinos (AHMED et al., 2019), javalis (WINN; WHITAKER, 2018), inclusive em humanos (ZRIBI et al., 2012), demonstrando que sua utilização para tal fim pode ser promissora.

3.4 Ozônio

O ozônio (O_3) é um gás formado por 3 átomos de oxigênio, tem uma estrutura cíclica e está presente em abundância na estratosfera, com papel fundamental na absorção da radiação ultravioleta (BOCCI, 2006). Além disso, é classificado como o segundo maior agente com potencial oxidante conhecido, ficando em desvantagem apenas quando comparado ao flúor (GUZEL-SEYDIM; GREENE; SEYDIM, 2004).

Sua presença na atmosfera pode ser altamente nociva quando inalado, devido ao pulmão conter baixa capacidade de produção de antioxidantes e neutralizantes (BOCCI, 2006; SUNNEN, 1988). Ainda que não elucidado totalmente o mecanismo oxidante do gás em questão, quando inalado, sua ação como inibidor da densidade espermática é citada em humanos (TILLET, 2006).

No entanto, acredita-se que apesar de atuar com seu potencial oxidante, o estresse oxidativo causado pelo gás pode ser útil, pois estimula os mecanismos de proteção das células (ALVES et al., 2004). Paradoxalmente, é observado que, se utilizado em baixas concentrações, o O_3 também pode atuar como um pró-antioxidante, promovendo um aumento no nível de enzimas antioxidantes e estimulando a produção de ATP através da ativação do ciclo de Krebs (LEÓN et al., 1998), ou mesmo ativando o fator nuclear eritroide 2 (NRF2), responsável por restaurar as mitocôndrias após estresse (GALIÈ et al., 2019).

3.4.1 Geração de Ozônio

O O_3 pode ser produzido de duas maneiras: espontaneamente pela ação de raios ultravioleta do sol ou de maneira artificial, por um gerador de ozônio medicinal. Nesse gerador há a passagem do oxigênio puro (O_2) por uma descarga elétrica de alta voltagem e alta frequência (HERNÁNDEZ; GONZÁLEZ, 2001), que dissocia o O_2 em duas frações de oxigênio, formando, como resultado de diversas colisões, a molécula de O_3 (VIEBAHN-HÄNSLER; LEÓN FERNÁNDEZ; FAHMY, 2012).

É importante levar em consideração que, em decorrência do O_3 produzido ter meia-vida muito curta, é necessário que, para aplicação terapêutica, sua produção seja na hora do uso, pois não é possível estocar o gás, em decorrência de que o mesmo rapidamente voltará a ser oxigênio (BECK; WASSER;

VIEBAHN-HÄNSLER, 1998; VIEBAHN-HÄNSLER; LEÓN FERNÁNDEZ; FAHMY, 2012).

3.5 Análise Computadorizada do Movimento Espermático

Um dos parâmetros de maior importância quando se deseja avaliar a qualidade seminal é a motilidade e o número de espermatozoides. No entanto, o envolvimento do fator humano faz com que essa avaliação subjetiva seja passível de erros, o que pode comprometer uma amostra (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002). Além disso, o movimento espermático pode ser mensurado por diversas características que não são possíveis de serem avaliadas subjetivamente (LIU; CLARKE; BAKER, 1991).

Diante da necessidade em se excluir tal subjetividade sobre a contagem e avaliação da cinética espermática, uma solução pode ser a adoção da análise computadorizada do movimento espermático (DEARING; KILBURN; LINDSAY, 2014), em que uma imagem é capturada por uma câmera acoplada a um microscópio de contraste de fase, enviada a um computador e cada espermatozoide é detectado e avaliado individualmente por um software sobre diversos parâmetros de cinética espermática: Motilidade Total (MT; %) e Progressiva (MP; %), que corresponde à proporção de células móveis do total avaliado, bem como o percentual de células em movimento progressivo, respectivamente; Velocidade de Trajeto (VAP; $\mu\text{m/s}$), é a velocidade média ininterrupta do trajeto; Velocidade Progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$), é a velocidade média em que a célula percorre em linha reta do ponto inicial ao final do trajeto; Velocidade Curvilinear (VCL; $\mu\text{m/s}$), que é a velocidade média entre cada posição capturada do trajeto percorrido pela célula; Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH, μm), em que a largura da oscilação da cabeça é medida conforme a célula se move; Frequência de Batimento Flagelar (BCF; Hz), mensurado pela frequência do movimento que a cabeça do espermatozóide faz para trás e para frente durante o trajeto percorrido; Retilinearidade (STR; %), é a média da proporção entre VSL/VAP; e Linearidade (LIN; %), como sendo a média da proporção entre VSL/VCL (KATHIRAVAN et al., 2008; MORTIMER, 2000b).

A avaliação dos diversos padrões de movimento pode ser um ponto importante com relação à hiperativação espermática, processo essencial no

transporte de gametas e penetração do oócito (MORTIMER; VAN DER HORST; MORTIMER, 2015). Passível de ser avaliado pela análise computadorizada, o processo de hiperativação se manifesta como um movimento espermático vigoroso, não progressivo e não linear (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002).

Existem ideias divergentes sobre quais os limites mínimos e máximos aceitáveis das características analisadas que possam servir como preditores de hiperativação ou não (AMANN, 1989; GRAHAM; MOCÉ, 2005; MORTIMER, 1997). Por outro lado, dentre os vários padrões de movimento avaliados pelo sistema de análise computadorizada, os índices de velocidade curvilinear (VCL), linearidade (LIN) e amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH) são descritos como os maiores preditores, uma vez que um espermatozoide hiperativado cursa com o aumento dos valores de ALH e VCL, bem como diminuição nos valores de LIN (MORTIMER, 1997; MORTIMER; MORTIMER, 1990; VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002).

Em animais, uma possível relação entre as características de cinética espermática e a fertilidade dos machos foi testada em diversas espécies (BATTUT et al., 2017; EVANGELISTA et al., 2016; FARRELL et al., 1998; HIRAI et al., 2001), sendo citados valores de VCL acima de 70 $\mu\text{m/s}$, LIN abaixo de 50 % e ALH acima de 7 μm em uma amostra hiperativada (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002).

3.6 Citometria de Fluxo

A avaliação via citometria de fluxo permite a mensuração via dispersão de luz ou emissão de fluorescência, de características como tamanho, granularidade e tipo de uma célula (ADAN et al., 2017). Dessa maneira, características estruturais da célula promovem a dispersão da luz, ao passo com que para a emissão de fluorescência se utilizam sondas fluorescentes como biomarcadores que se ligam à célula ou ao seu componente, para que esse possa ser identificada (MACEY, 2007).

Assim que inseridas no citômetro de fluxo, as células suspensas em um líquido passam uma a uma por uma fonte de luz que ao cruzá-las é direcionado a vários filtros e espelhos capazes de detectar várias faixas de comprimento e ondas (BROWN; WITTEWER, 2000).

A fonte de luz mais utilizada nos aparelhos de citometria de fluxo é o laser de argônio de baixa potência, com capacidade de emissão a 488 nm e o laser hélio-neon, com capacidade de emissão de 633 nm, sendo que, cada laser tem capacidade de excitar diferentes tipos de fluorocromos (HERZENBERG et al., 2006; SHAPIRO, 2003), que por sua vez, respondem absorvendo essa energia e emitindo em um comprimento de onda mais longo (FANG; RAMASAMY, 2015).

A emissão de luz dos fluorocromos pode variar de acordo com o estado em que se encontram no microambiente. Sendo assim, o fluorocromo vai ligar-se a uma estrutura celular específica (seja proteína, DNA, RNA, lipídios), e a partir dessa ligação, haverá a emissão do seu comprimento de onda para detecção pelos filtros do citômetro (BARNETT et al., 2013; ERRANTE et al., 2016; GOLIM et al., 2007).

Esses são captados e enviados para análise por um software de computador, que traduz os parâmetros de tamanho e granularidade da célula e os diversos comprimentos de onda emitidos pelos fluorocromos (GREEN; WACHSMANN-HOGIU, 2015) e após a digitalização dos resultados, os exibe no formato de histogramas ou mesmo a formação de imagens de pontos, que correspondem às células identificadas (BROWN; WITTEWER, 2000).

Uma série de sondas fluorescentes tem sido adotada para mensurar a capacidade funcional de espermatozóides, com sua utilização descrita em diversas espécies animais (CELEGHINI et al., 2010; GARNER; JOHNSON, 1995).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIEC. **Perfil da pecuária no BrasilBeefREPORT**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br/control/uploads/arquivos/sumario2019portugues.pdf>>.
- ADAN, A. et al. Flow cytometry: basic principles and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 163–176, 2017.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S. Role of reactive oxygen species in female reproduction. Part I. Oxidative stress: A general overview. **Agro Food Industry**

Hi-Tech, v. 16, n. 1, p. 21–25, 2005.

AGARWAL, A.; SALEH, R. A.; BEDAIWY, M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 79, n. 4, p. 829–843, 2003.

AGRILLO, A. et al. New therapeutic protocol in the treatment of avascular necrosis of the jaws. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 17, n. 6, p. 1080–1083, 2006.

AHMED, H. et al. 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**, v. 134, p. 18–23, 2019.

ALVES, G. E. S. et al. Efeitos do ozônio nas lesões de reperfusão do jejuno em eqüinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 56, n. 4, p. 433–437, 2004.

AMANN, R. P. Seminal Can Sample the Fertility Be Predicted Potential of a Accurately ?*. **Journal of andrology**, v. 10, n. 2, p. 89–98, 1989.

ANDRADE, E. R.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p. 79–85, 2010.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.

AVDATEK, F. et al. Supplementation of quercetin for advanced DNA integrity in bull semen cryopreservation. **Andrologia**, v. 50, n. 4, p. 1–7, 2018.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutricao**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BARJA, G. Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: Implications for aging studies.

Rejuvenation Research, v. 10, n. 2, p. 215–223, 2007.

BARNETT, D. et al. Validation of cell-based fluorescence assays: Practice guidelines from the ICSH and ICCS - Part IV - Postanalytic considerations.

Cytometry Part B - Clinical Cytometry, v. 84, n. 5, p. 309–314, 2013.

BARUSELLI, P. S. **Avaliação do mercado de IATF no Brasil**. Disponível em: <<http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/>>. Acesso em: 12 fev. 2020.

BATTUT, I. B. et al. Prediction of the fertility of stallion frozen-thawed semen using a combination of computer-assisted motility analysis, microscopical observation and flow cytometry. **Theriogenology**, v. 97, p. 186–200, 2017.

BECK, E. G.; WASSER, G.; VIEBAHN-HÄNSLER, R. Current status of ozone therapy - Empirical developments and basic research. **Forschende Komplementarmedizin und Klassische Naturheilkunde**, v. 5, n. 2, p. 61–75, 1998.

BEHLING, E. B. et al. Flavonóide quercetina: Aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. September, p. 285–292, 2004.

BIANCHI, M. DE L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais Livres e os Principais Antioxidantes da Dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123–130, 1989.

BILODEAU, J. F. et al. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, n. 3, p. 282–288, 2000.

BOCCI, V. A. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. **Archives of Medical Research**, v. 37, p. 425–435, 2006.

- BOLLWEIN, H.; BITTNER, L. Impacts of oxidative stress on bovine sperm function and subsequent in vitro embryo development. **Animal Reproduction**, v. 15, n. Irrs, p. 703–710, 2018.
- BROWN, M.; WITTWER, C. Flow cytometry: Principles and clinical applications in hematology. **Clinical Chemistry**, v. 46, n. 8 II, p. 1221–1229, 2000.
- BUSTAMANTE-FILHO, I. C.; PEDERZOLLI, C. D.; SGARAVATTI, A. M. Activity of glutathione peroxidase and catalase in stallion semen during cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 94, n. 1–4, p. 70–73, 2006.
- CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. et al. Melatonin in sperm biology: Breaking paradigms. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. s4, p. 11–21, 2014.
- CELEGHINI, E. C. C. et al. Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 3, p. 536–543, 2010.
- CHACUR, M. G. M. et al. Efeito de meios diluentes na viabilidade de sêmen congelado bovino. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 1, p. 346–355, 2012.
- DEARING, C. G.; KILBURN, S.; LINDSAY, K. S. Validation of the sperm class analyser CASA system for sperm counting in a busy diagnostic semen analysis laboratory. **Human Fertility**, v. 17, n. 1, p. 37–44, 2014.
- DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades Antioxidantes De Compostos Fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33–40, 2004.
- DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47–95, 2002.
- DUQUE C, J. E.; ROJANO, B. A.; RESTREPO B, G. Criotolerancia de Semen

Equino Congelado con Aditivos en el Diluyente TT - Cryotolerance of Stallion
Semen Frozen with Additives in the Extender. **Revista de Investigaciones
Veterinarias del Perú**, v. 28, n. 1, p. 120–129, 2017.

ERRANTE, P. R. et al. Flow cytometry: a literature review. **Revista de Ciências
Médicas e Biológicas**, v. 14, n. 2, p. 221, 2016.

EVANGELISTA, L. S. M. et al. Avaliação in vitro do sêmen criopreservado de
cães naturalmente infectados por Leishmania sp. **Arquivo Brasileiro de
Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 3, p. 651–657, 2016.

FANG, Y.; RAMASAMY, R. P. Current and prospective methods for plant
disease detection. **Biosensors**, v. 5, n. 3, p. 537–561, 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.

GALIÈ, M. et al. The role of Nrf2 in the antioxidant cellular response to medical
ozone exposure. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 16, p.
1–15, 2019.

GARNER, D. L.; JOHNSON, L. A. Viability Assessment of Mammalian Sperm
Using SYBR-14 and Propidium Iodide1. **Biology of Reproduction**, v. 53, n. 2,
p. 276–284, 1995.

GIBB, Z. et al. Quercetin improves the postthaw characteristics of
cryopreserved sex-sorted and nonsorted stallion sperm. **Theriogenology**, v.
79, n. 6, p. 1001–1009, 2013.

GOLIM, M. D. A. et al. Conjugação e validação de controle isotópico IgG1-FITC
para uso em citometria de fluxo. **Revista Brasileira de Hematologia e
Hemoterapia**, v. 29, n. 4, p. 361–368, 2007.

- 475 GRAHAM, J. K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen.
476 **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 492–504, 2005.
477
- 478 GREEN, R.; WACHSMANN-HOGIU, S. Development, History, and Future of
479 Automated Cell Counters. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 35, n. 1, p. 1–10,
480 2015.
481
- 482 GRIVEAU, J. F.; LE LANNOU, D. Reactive oxygen species and human
483 spermatozoa: Physiology and pathology. **International Journal of Andrology**,
484 v. 20, n. 2, p. 61–69, 1997.
485
- 486 GUZEL-SEYDIM, Z. B.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Use of ozone in the
487 food industry. **LWT - Food Science and Technology**, v. 37, n. 4, p. 453–460,
488 2004.
489
- 490 HERNÁNDEZ, O. D.; GONZÁLEZ, R. C. Ozonoterapia en úlceras flebostáticas.
491 **Revista Cubana de Cirugia**, v. 40, n. 2, p. 123–129, 2001.
492
- 493 HERZENBERG, L. A. et al. Interpreting flow cytometry data: a guide for the
494 perplexed - Supplementary Information. **Nature Immunology**, v. 7, n. 7, p.
495 681–685, 2006.
496
- 497 HIRAI, M. et al. Objectively Measured Sperm Motility and Sperm Head.
498 **Computer**, v. 22, n. 1, p. 104–110, 2001.
499
- 500 KATHIRAVAN, P. et al. Computer automated motion analysis of crossbred bull
501 spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster
502 oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 104, n. 1, p. 9–17, 2008.
503
- 504 LEITE, P. A. et al. Criopreservação do Sêmen Bovino. **Journal of Health**
505 **Sciences**, v. 13, n. 4, p. 279–286, 2011.
506
- 507 LENZI, A. et al. Lipoperoxidation Damage of Spermatozoa Polyunsaturated
508 Fatty Acids (PUFA): Scavenger Mechanisms and Possible Scavenger

- Therapies. **Frontiers in Bioscience**, v. 5, p. 1–15, 2000.
- LEÓN, O. S. et al. Ozone oxidative preconditioning: A protection against cellular damage by free radicals. **Mediators of Inflammation**, v. 7, n. 4, p. 289–294, 1998.
- LIU, D. Y.; CLARKE, G. N.; BAKER, H. W. G. Relationship Between Sperm Motility Assessed with the Hamilton-Thorn Motility Analyzer and Fertilization Rates In Vitro. **Journal of andrology**, v. 12, n. 4, p. 231–239, 1991.
- MACEY, M. G. **Flow Cytometry - Principles and Applications**. [s.l: s.n.]. v. 3
- MACMILLAN, K. L.; TIKU, J. L.; HART, N. L. Toxic effects of aromatic amino acids on the livability of bull spermatozoa. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 5, p. 1039–1045, 1972.
- MAIA, M.; BICUDO, S. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 4, p. 183–193, 2009.
- MAKKER, K.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. Oxidative stress & male infertility. **Indian Journal of Medical Research**, v. 129, n. 4, p. 357–367, 2009.
- MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase: The First Twenty Years (1968-1988). **Free Radical Biology and Medicine**, v. 5, p. 363–369, 1988.
- MCNIVEN, M. A.; RICHARDSON, G. F. Effect of quercetin on capacitation status and lipid peroxidation of stallion spermatozoa. **Cell Preservation Technology**, v. 4, n. 3, p. 169–177, 2006.
- MEISTER, A. Glutathione , Ascorbate , and Cellular Protection1. p. 1969–1976, 1994.

- MORTIMER, D. Sperm Preparation Methods. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 3, p. 357–66, 2000a.
- MORTIMER, S. T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v. 3, n. 5, p. 403–439, 1997.
- MORTIMER, S. T. CASA — Practical Aspects Andrology Lab Corner. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 515–524, 2000b.
- MORTIMER, S. T.; MORTIMER, D. Kinematics of Human Spermatozoa Incubated Under Capacitating Conditions. **Journal of Andrology**, v. 11, n. 3, p. 195–203, 1990.
- MORTIMER, S. T.; VAN DER HORST, G.; MORTIMER, D. The future of computer-aided sperm analysis. **Asian Journal of Andrology**, v. 17, n. 4, p. 545–553, 2015.
- 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.
- PATEL, H. A. et al. Effect of different antioxidant additives in semen diluent on cryopreservability (-196°C) of buffalo semen. **Veterinary World**, v. 9, n. 3, p. 299–303, 2016.
- RUIZ-PESINI, E. et al. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 8 I, p. 1616–1620, 1998.
- SAALU, L. C. The incriminating role of reactive oxygen species in idiopathic male infertility: An evidence based evaluation. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 13, n. 9, p. 413–422, 2010.
- SHAPIRO, H. M. **Practical Flow Cytometry**. [s.l: s.n.].

- SILVA, E. C. B. et al. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. **Theriogenology**, v. 77, n. 8, p. 1722–1726, 2012.
- SILVA, E. C. B. et al. High resveratrol or quercetin concentrations reduce the oscillation index of frozen goat semen. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 68, n. 5, p. 1237–1243, 2016.
- SILVA, M. L. C. et al. Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 31, n. 3, p. 669–682, 2010.
- SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, p. 370–384, 2011.
- SIMÕES, V. DO N. et al. Síntese, caracterização e estudo das propriedades de um novo complexo mononuclear contendo quercetina e íon Ga(III). **Quimica Nova**, v. 36, n. 4, p. 495–501, 2013.
- SUNNEN, G. V. Ozone in Medicine: Overview and Future Directions. **J. Adv. Med**, v. 1, n. 1, p. 159–174, 1988.
- TILLET, T. Semen quality decline linked to ozone pollution. **Environmental health perspectives**, v. 114, n. 3, p. 177, 2006.
- TIRONI, S. M. T. et al. Effects of treatment with quercetin on the quality of cryopreserved bovine semen. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 47, n. 1, p. 1–7, 2019.
- TOSIC, J.; WALTON, A. Metabolism of spermatozoa. The formation and elimination of hydrogen peroxide by spermatozoa and effects on motility and survival. **The Biochemical journal**, v. 47, n. 2, p. 199–212, 1950.

- TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **Journal of Physiology**, v. 552, n. 2, p. 335–344, 2003.
- TVRDÁ, E. et al. Impact of Seminal Chemical Elements on the Oxidative Balance in Bovine Seminal Plasma and Spermatozoa. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 2013, p. 1–8, 2013.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer Assisted Semen Analyzers In Andrology Research and Veterinary Practice. **Theriogenology**, n. 57, p. 149–179, 2002.
- VIEBAHN-HÄNSLER, R.; LEÓN FERNÁNDEZ, O. S.; FAHMY, Z. Ozone in Medicine: The Low-Dose Ozone Concept-Guidelines and Treatment Strategies. **Ozone: Science and Engineering**, v. 34, n. 6, p. 408–424, 2012.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 481–492, 2000.
- WINN, E.; WHITAKER, B. D. Quercetin Supplementation during Boar Semen Thawing and Incubation Improves Sperm Characteristics. **Journal of Animal Science**, v. 96, n. August, p. 261–262, 2018.
- YUTING, C. et al. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 9, p. 19–21, 1990.
- 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.

4 CAPÍTULO 2 – PAPEL DA QUERCETINA E DO OZÔNIO NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE BOVINOS (Redigido conforme
as normas da revista Animal Science Journal)

ROLE OF QUERCETIN AND OZONE IN THE CRYOPRESERVATION OF
BOVINE SEMEN

Willian Vaniel Alves dos Reis^{1*}

Mozarth Vieira Junior¹

Raiza Rocha Pereira¹

Bianca Rodrigues Acácio¹

Eliane Vianna da Costa-e-Silva¹

Gustavo Guerino Macedo¹

Breno Fernandes Barreto Sampaio¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul,
Campo Grande, MS, Brasil

*Correspondência:

Willian Vaniel Alves dos Reis, Departamento de Reprodução Animal, Avenida Senador Felinto
Muller, 2443, CEP: 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil.

Email: willian.vet.ufms@gmail.com

RESUMO

O presente experimento teve como objetivo reduzir os efeitos das crioinjúrias
causadas ao sêmen de bovinos como resultado do processo de criopreservação.
Para tal, quinze ejaculados foram coletados de três touros jovens da raça Nelore
e submetidos ao congelamento em 7 grupos experimentais: grupo C
(CONTROLE), grupo O15 (15 µg/ml de ozônio), grupo O30 (30 µg/ml de ozônio),
grupo O60 (60 µg/ml de ozônio), grupo Q25 (25 µg/ml de quercetina), grupo Q50
(50 µg/ml de quercetina) e grupo Q100 (100 µg/ml de quercetina). As amostras

foram avaliadas pós-descongelamento (M0) e pós-TTR (M30) via sistema computadorizado de análise de sêmen e citometria de fluxo, sobre parâmetros de cinética espermática e viabilidade da estrutura celular (MT, MP, VCL, LIN, ALH, integridade de membrana plasmática, integridade acrossomal, potencial mitocondrial, fluidez de membrana e peroxidação lipídica). Não houve diferença estatística ($P>0.05$) entre o grupo controle e tratado com quercetina para os parâmetros avaliados em M0 e M30. A suplementação com ozônio, embora tenha expressado menores resultados para cinética espermática ($p<0.05$) e menor potencial mitocondrial em M30 ($p<0.05$), não prejudicou as demais estruturas celulares avaliadas. Conclui-se que a quercetina nas concentrações utilizadas não promove ganhos significativos ao sêmen congelado, bem como também não demonstrou citotoxicidade. No entanto, o ozônio nas concentrações adotadas não melhora os parâmetros de cinética espermática, não sendo observado seu efeito paradoxal como antioxidante para essas características, porém o fato de que o gás não prejudicou a estrutura da célula espermática abre vertentes para testes com dosagens menores

Palavras-chave: espermatozóide; espécies reativas de oxigênio; peroxidação lipídica.

ABSTRACT

The present experiment aimed to reduce the effects of cryoinjury caused to bovine semen as a result of the cryopreservation process. For this purpose, fifteen ejaculates were collected from three young Nellore bulls and subjected to freezing in 7 experimental groups: group C (CONTROL), group O15 (15 μ g/ml of

ozone), group O30 (30µg/ml of ozone), group O60 (60µg/ml of ozone), group Q25 (25µg/ml of quercetin), group Q50 (50 µg/ml of quercetin) and group Q100 (100 µg/ml of quercetin). The samples were evaluated post-thaw (M0) and post-TTR (M30) via a computerized semen analysis system and flow cytometry, on parameters of sperm kinetics and cell structure viability (MT, MP, VCL, LIN, ALH, plasma membrane integrity, acrosomal integrity, mitochondrial potential, membrane fluidity and lipid peroxidation). There was no statistical difference ($P>0.05$) between the control and quercetin-treated groups for the parameters evaluated at M0 and M30. Ozone supplementation, although it expressed lower results for sperm kinetics ($p<0.05$) and lower mitochondrial potential in M30 ($p<0.05$), did not harm the other cellular structures evaluated. It is concluded that quercetin in the concentrations used does not promote significant gains to frozen semen, nor did it demonstrate cytotoxicity. However, ozone in the adopted concentrations does not improve the parameters of sperm kinetics, and its paradoxical effect is not observed as an antioxidant for these characteristics, however the fact that the gas did not harm the structure of the sperm cell opens up strands for tests with smaller dosages.

Keywords: Spermatozoa; reactive oxygen species; lipid peroxidation.

Introdução

Todo o estresse térmico causado pela criopreservação provoca uma modificação no metabolismo energético da célula. Dessa maneira, ocorre um estresse oxidativo, levando ao aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs), que quando estão em maior quantidade do que os antioxidantes, são relacionadas principalmente com a redução da motilidade espermática (Ruiz-Pesini et al., 1998). O resultado desse processo é uma considerável proporção de células que não resistem, o que pode comprometer sua utilização final, na fecundação do oócito (Leite et al., 2011). Estima-se que quando comparado ao sêmen fresco, o sêmen congelado apresente cerca de 50% de queda de viabilidade espermática (Chacur et al., 2012).

Naturalmente, o ejaculado bovino é composto por antioxidantes que atuam na neutralização das EROs, como as enzimas Superóxido Dismutase, Catalase e Glutathione Peroxidase, Vitamina A e Vitamina E (Tvrdá et al., 2013; Patel et al., 2016; Bollwein and Bittner, 2018). Entretanto, em decorrência do processo de diluição do sêmen para a criopreservação, há uma redução na disponibilidade desses antioxidantes, o que pode culminar no aumento da produção de EROs (Maia and Bicudo, 2009; Andrade et al., 2010; Duque C et al., 2017).

Por esse motivo, tem se estudado o efeito da suplementação de antioxidantes aos meios de diluição para preparo, manutenção e criopreservação espermática, a fim de reduzir os efeitos causados por esse possível desequilíbrio (Mortimer, 2000). Esses antioxidantes são classificados como enzimáticos ou não-enzimáticos, de maneira com que os enzimáticos são

compostos por enzimas endógenas e os não-enzimáticos são advindos principalmente de origem nutricional (Barbosa et al., 2010).

Encontrado em grande quantidade em frutas e verduras e devido sua alta capacidade de sequestro e neutralização de radicais livres em decorrência dos grupos hidroxila pertencentes à sua estrutura (Behling et al., 2004), O flavonóide quercetina tem sido estudado como um potente antioxidante não-enzimático (Silva et al., 2012). Sua atividade já foi descrita para várias outras funções, tais como antitumoral, antiinflamatória e antimicrobiana, além de antioxidante (Santos and Rodrigues, 2017) e sua utilização na manutenção da viabilidade espermática tem sido adotada com sucesso em várias espécies como equinos (McNiven and Richardson, 2006; Gibb et al., 2013; Tironi et al., 2019), caprinos (Silva et al., 2016), bovinos (Tironi et al., 2019), bubalinos (Ahmed et al., 2019), javalis (Winn and Whitaker, 2018), inclusive em humanos (Zribi et al., 2012), demonstrando que sua utilização para tal fim pode ser promissora.

Por sua vez, o gás ozônio (O_3), ainda que conhecido por ser um poderoso oxidante (Sunnan, 1988), tem sido desafiado para um possível efeito antioxidante indireto, na perspectiva de que, se utilizado com segurança, seu poder oxidante induza um leve estresse oxidativo, promovendo a elevação dos antioxidantes enzimáticos (Alves et al., 2004), causando assim um bloqueio da geração de radicais livres (Agrillo et al., 2006). Porém, sua atividade para tal fim ainda não foi avaliada em espermatozóides.

Diante dos fatos apresentados, o presente experimento teve como objetivo avaliar a adição do flavonoide Quercetina ou do gás Ozônio ao diluente

de congelação, visando a redução das crioinjúrias causadas ao sêmen de bovinos.

Material e métodos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, Campo Grande - MS, sob protocolo nº 1.082/2019.

Animais utilizados:

Foram utilizados cinco touros *Bos indicus* da raça Nelore, com idade entre 24 e 36 meses, mantidos em piquetes, sob as mesmas condições ambientais e previamente selecionados por exame andrológico, cujas características macroscópicas e microscópicas estavam de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal (CBRA, 2013).

Quercetina e Ozônio:

Foi utilizado diluente comercial Botu-Bov® - BB (Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil). Para os tratamentos com quercetina foi adotada quercetina sólida (Sigma- Aldrich Brasil Ltda, São Paulo- SP) que, devido sua alta lipofilicidade, foi previamente diluída em dimetilsulfoxido (DMSO), de maneira com que a concentração total do veículo fosse 0,1% após sua incorporação no sêmen. Essa concentração corresponde à concentração máxima não nociva de DMSO aos espermatozoides (Meamar et al., 2012).

O ozônio foi obtido através de um aparelho portátil gerador de ozônio modelo O&L 1.5 (Ozone & Life®), programado para liberar um fluxo de O₂ medicinal suficiente para produzir as concentrações indicadas para os grupos experimentais. Uma seringa estéril de 5 ml foi acoplada ao aparelho antes de iniciado o processo, onde o gás foi armazenado. Em seguida, para a incorporação, o sêmen já diluído para a quantidade correta de doses a serem envasadas foi colocado em frasco de vidro ao qual, com auxílio da seringa, foi direcionado o gás. Assim, o ozônio reage em segundos, incorporando-se ao conteúdo líquido através de um sistema de microbolhas (Beck et al., 1998).

Coleta e criopreservação das amostras:

Foram realizadas três coletas por touro (n=15), com o auxílio de eletroejaculador. Imediatamente após a colheita foi mensurado o volume do ejaculado (mL), concentração espermática ($\times 10^6$ espermatozóides/mL), motilidade (%) e vigor (1-5; CBRA, 2013). Considerou-se apto ao congelamento o ejaculado que apresentou valores mínimos de 80% para motilidade total e vigor 3.

Cada ejaculado foi distribuído em sete grupos experimentais, sendo eles: grupo C (CONTROLE - sem adição de ozônio ou quercetina), grupo O15 (15 µg/ml de ozônio), grupo O30 (30 µg/ml de ozônio), grupo O60 (60 µg/ml de ozônio), grupo Q25 (25 µg/ml de quercetina), grupo Q50 (50 µg/ml de quercetina) e grupo Q100 (100 µg/ml de quercetina).

O sêmen foi envasado em palhetas médias e submetido ao processo de criopreservação convencional (Abud et al., 2014). Posteriormente, essas foram

armazenadas em botijão criogênico até o momento em que foram descongeladas para avaliação pós-descongelamento (Fig. 1).

Descongelamento e análises pós-descongelamento:

O sêmen foi descongelado pela imersão das palhetas em banho-maria a 37°C por 30 segundos. As análises foram realizadas imediatamente após o descongelamento (M-0) e após teste de termorresistência rápido (TTR; M-30; Vianna et al., 2009). Antes que se realizasse a avaliação em cada momento, cada amostra foi novamente incubada à temperatura de 37°C por 2 minutos para que houvesse estabilização das células espermáticas.

Foram realizadas análises de cinética espermática por meio de sistema computadorizado (SCA® - Sperm Class Analyzer, Microptic, Barcelona, Espanha). As variáveis utilizadas foram motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm) e linearidade (LIN, %), apontados como os que melhor correspondem ao grau de hiperativação espermática em uma amostra de sêmen (Nassar et al., 1998; Verstegen et al., 2002).

Também foram realizados testes de integridade de membrana plasmática e acrossomal, fluidez de membrana, atividade mitocondrial e susceptibilidade à lipoperoxidação via citometria de fluxo (CitoFLEX®, Beckman Coulter, Brea, Califórnia, EUA). A fim de diminuir a concentração e facilitar a leitura pelo aparelho, cada amostra foi previamente diluída em solução tampão TALP-PVA e foi adicionado Hoechst 33342 (H33342; 7 μM ; Thermo Scientific, Fisher, IL, EUA), uma sonda capaz de corar DNA das células espermáticas, o que evita o confundimento de outras partículas com o espermatozoide na hora da avaliação

(Yániz et al., 2012). As demais sondas fluorescentes com os respectivos parâmetros avaliados encontram-se na tabela 1.

O citômetro de fluxo analisou 10.000 células por amostra e os espermatozoides foram classificados em 4 grupos: membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal íntegra (PI-PNA-; %), membrana plasmática íntegra com alto potencial mitocondrial (PI-MST+; %) membrana íntegra e bicamada organizada (YO-MERO-; %) e células peroxidadas (PERO; %).

Análise estatística:

O delineamento utilizado foi em blocos casualizados, considerando cada touro como um bloco. As variáveis respostas foram analisadas por ANOVA, considerando amostras pós-descongelação e pós-TTR (M-0 e M-30), com auxílio do software Statistical Analysis System (SAS® University Edition). Utilizou-se o comando RANDOM (PROC GLIMMIX do SAS) para determinar as probabilidades de interação ao longo do tempo, considerando um nível de significância de 5%.

Resultados e discussão

Sendo a motilidade uma das primeiras funções afetadas pela ação das EROs em decorrência do estresse oxidativo (Aitken et al., 2014), bem como valores de VCL acima de 70 $\mu\text{m/s}$, LIN abaixo de 50 % e ALH acima de 7 μm para classificar um espermatozóide como hiperativado (Verstegen et al., 2002), esperava-se para fins de comparação com os antioxidantes testados, que o grupo CONTROLE expressasse valores menores de motilidade total e progressiva, e também VCL, LIN e ALH condizentes com a hiperativação. No entanto, o grupo CONTROLE expressou valores considerados altos para MT e

MP pós-descongelamento (CBRA, 2013; Tab. 2), demonstrando que os touros cujos ejaculados foram criopreservados eram bons congeladores e que o processo de criopreservação foi bem conduzido.

Quando comparada ao grupo CONTROLE, não verificou-se melhoria nas variáveis de cinética analisadas ($P>0.05$) como efeito da suplementação com quercetina, embora MT e MP do grupo tratado tenham sido numericamente maiores no momento M-0 (Tabela 2). A quercetina também não promoveu indícios de hiperativação nas amostras. Tais resultados nos levam a crer que embora os achados sejam significativamente iguais, provavelmente a quercetina teria melhor ação se o semen analisado fosse de baixa congelabilidade, oferecendo maior desafio para o antioxidante em questão.

Por outro lado, o O_3 reduziu os valores para as mesmas variáveis tanto em M-0 quanto em M-30 (Tab. 3; Fig. 2), mostrando que nessas concentrações o seu poder oxidante (Sunnen, 1988) tenha prevalecido, provavelmente porque as concentrações utilizadas não foram suficientemente baixas para que o ozônio expressasse seu fator pró-antioxidante (Alves et al., 2004), ou seja, sua capacidade de estimular a produção de antioxidantes, o que se ocorresse, o tornaria biologicamente útil para tal prática.

Testando a suplementação de 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/ml}$ de quercetina na criopreservação de sêmen de touro Holandês, Avdatek et al. (2018) verificaram que, com exceção da menor concentração (50 $\mu\text{g/ml}$), ao descongelamento, o tratamento com quercetina exibiu MT e MP menor bem como as demais características de cinética pioraram à medida com que se aumentou a dosagem do antioxidante em questão, ao ponto de serem significativamente inferiores ao grupo controle ($P<0.05$) nas duas maiores concentrações testadas. Essa

divergência entre nossos resultados e os dos autores em questão com a utilização das mesmas concentrações pode ser correlacionada com o veículo utilizado para diluir a quercetina, visto que, nosso veículo foi o DMSO, oferecendo menor agressão à célula do que o etanol (Timm et al., 2013), adotado por eles.

Nosso experimento verificou semelhanças entre todos os tratamentos com relação às variáveis VCL, LIN e ALH. Em experimento com touros Brahman, Tironi et al. (2019) testaram concentrações menores (5, 15 e 20 µg/ml) e embora também tenham observado um incremento nos valores de MT e MP no sêmen suplementado com quercetina, também não encontraram significância em seus resultados para as doses testadas. Contudo, os mesmos autores verificaram que os valores de LIN aumentaram conforme se aumentou a dose do antioxidante, sendo superiores ($p < 0.05$) ao controle na maior concentração de quercetina. O que chama atenção no trabalho dos autores em questão é o fato de que o grupo controle não teve alto percentual de motilidade total (7,4%) e progressiva (5,01%), indicando que a quercetina agiu melhorando o índice de linearidade em amostras com qualidade inferior.

Os resultados da avaliação via citometria de fluxo para integridade de membrana plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e peroxidação lipídica não indicaram diferença significativa entre controle e os tratamentos com quercetina (Tabela 2). Ainda que se tenha observada ligeira melhora nos valores de MT e MP, esse não pôde ser explicado por um maior potencial mitocondrial (PI-MST+; $p = 0.9782$), o que faria com que o espermatozóide tivesse maior motilidade. No entanto, assim como não se reverteu em benefícios, a adição de quercetina também não foi deletéria à

919 estrutura celular. As mesmas concentrações, utilizadas por Avdatek et al. (2018)
920 em bovinos e as doses de 0.2 e 0.3 mM de quercetina testadas na espécie
921 equina por Seifi-Jamadi et al. (2016) exerceram efeito deletério sobre a
922 integridade de membrana, porém com redução da peroxidação lipídica para o
923 segundo autor relatado. Diante disso, há indícios de que pode haver, além de
924 interação com o veículo utilizado, uma interação da espécie animal com relação
925 à ação do referido antioxidante, já que a quercetina em equinos melhora alguns
926 aspectos enquanto piora outros.

927 Os estudos relacionados à suplementação do sêmen com ozônio são
928 escassos, o que dificulta a escolha da dose ótima que atenderia ao fator pró-
929 antioxidante do referido gás. Ao observar MT, MP, VCL, ALH e LIN, verificou-se
930 que todos os valores para ozônio foram menores do que para o grupo controle,
931 com diminuição gradual conforme o aumento da dose e que provavelmente os
932 valores baixos para MT e MP (Fig. 2) se refletiram nos demais valores baixos.
933 No entanto, mesmo não tendo expressado para cinética seu efeito paradoxal
934 indutor da produção de antioxidantes, foi demonstrado pelas análises realizadas
935 via citometria de fluxo que a diminuição dos parâmetros de cinética espermática
936 tanto em M0 quanto em M30 (Tabela 3; Figura 2) não se reverteu em danos
937 estruturais à célula ($p>0.05$), e que embora em M-30 o grupo controle tenha sido
938 superior na variável PI-MST+ ($p=0.0334$), os resultados de comparação com o
939 grupo controle não indicaram diferença ($p>0.05$) para os demais parâmetros
940 testados pela citometria de fluxo (Tabela 3). Os resultados encontrados sugerem
941 que, embora os valores de cinética espermática tenham sido prejudicados à
942 suplementação com ozônio, esse não danificou totalmente a estrutura celular,
943 permanecendo as células iguais ao controle no que diz respeito a PI-PNA-

(membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal íntegra), YO-MERO- (membrana íntegra e bicamada organizada) e PERO (porcentagem de células peroxidadas). Esse resultado nos instiga a pensar no efeito do ozônio caso a dosagem fosse menor, já que para cinética os valores pioraram com o aumento da dose e para estrutura não houve tamanho prejuízo.

Conclusões

A partir dos resultados expostos, foi possível concluir que a quercetina nas concentrações utilizadas não promove ganhos significativos ao sêmen congelado, bem como também não demonstrou citotoxicidade. No entanto, foi observado que o ozônio nas concentrações adotadas não promove melhoria nos parâmetros de cinética espermática, não sendo observado seu efeito paradoxal como antioxidante para essas características, porém o fato de que o gás não prejudicou a estrutura da célula espermática não inviabiliza sua utilização, sendo necessário testar doses menores para tal fim.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001". Agradecemos também à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e ao Laboratório Multiuso de Reprodução Animal (FAMEZ/UFMS) que nos cederam as instalações para a realização dos experimentos.

Referências

Abud, C. O. G., L. J. Abud, J. C. O. Neto, M. A. N. Dode, J. R. B. Sereno, and C.

- 970 F. Martins. 2014. Comparação entre os sistemas automatizado e convencional
971 de criopreservação de sêmen bovino. *Cienc. Anim. Bras.* 15:32–37.
972 doi:10.5216/cab.v15i1.12233.
- 973
- 974 Agrillo, A., M. T. Petrucci, M. Tedaldi, M. C. Mustazza, S. M. F. Marino, C.
975 Gallucci, and G. Iannetti. 2006. New therapeutic protocol in the treatment of
976 avascular necrosis of the jaws. *J. Craniofac. Surg.* 17:1080–1083.
977 doi:10.1097/01.scs.0000249350.59096.d0.
- 978
- 979 Ahmed, H., S. Jahan, M. M. Salman, and F. Ullah. 2019. Stimulating effects of
980 Quercetin (QUE) in tris citric acid extender on post thaw quality and in vivo fertility
981 of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Theriogenology*. 134:18–23.
982 doi:10.1016/j.theriogenology.2019.05.012. Available from:
983 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.012>
- 984
- 985 Aitken, R. J., T. B. Smith, M. S. Jobling, M. A. Baker, and G. N. De Iuliis. 2014.
986 Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J. Androl.* 16:31–38.
987 doi:10.4103/1008-682X.122203.
- 988
- 989 Alves, G. E. S., J. M. G. Abreu, J. D. Ribeiro Filho, L. A. L. Muzzi, H. P. Oliveira,
990 R. J. Tannus, and T. Buchanan. 2004. Efeitos do ozônio nas lesões de
991 reperfusão do jejuno em eqüinos. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 56:433–437.
992 doi:10.1590/s0102-09352004000400002.
- 993
- 994 Andrade, E. R., M. M. Seneda, and a a Alfieri. 2010. Consequências da produção

- 995 das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos
996 antioxidantes. *Rev. Bras. Reprodução Anim.* 34:79–85.
- 997
- 998 Avdatek, F., D. Yeni, M. E. İnanç, B. Çil, B. P. Tuncer, R. Türkmen, and U.
999 Taşdemir. 2018. Supplementation of quercetin for advanced DNA integrity in bull
1000 semen cryopreservation. *Andrologia.* 50:1–7. doi:10.1111/and.12975.
- 1001
- 1002 Barbosa, K. B. F., N. M. B. Costa, R. De Cássia Gonçalves Alfenas, S. O. De
1003 Paula, V. P. R. Minim, and J. Bressan. 2010. Estresse oxidativo: Conceito,
1004 implicações e fatores modulatórios. *Rev. Nutr.* 23:629–643. doi:10.1590/S1415-
1005 52732010000400013.
- 1006
- 1007 Beck, E. G., G. Wasser, and R. Viebahn-Hänsler. 1998. Current status of ozone
1008 therapy - Empirical developments and basic research. *Forschende*
1009 *Komplementarmedizin und Klass. Naturheilkd.* 5:61–75. doi:10.1159/000021078.
- 1010
- 1011 Behling, E. B., M. C. Sendão, H. D. C. Francescato, L. M. G. Antunes, and M. de
1012 L. P. Bianchi. 2004. Flavonóide quercetina: Aspectos gerais e ações biológicas.
1013 *Aliment. e Nutr.* 15:285–292.
- 1014
- 1015 Bollwein, H., and L. Bittner. 2018. Impacts of oxidative stress on bovine sperm
1016 function and subsequent in vitro embryo development. *Anim. Reprod.* 15:703–
1017 710. doi:10.21451/1984-3143-AR2018-0041.
- 1018
- 1019 Chacur, M. G. M., H. S. Dias, F. O. Papa, B. A. Louvison, M. M. Calesco, and P.

- 1020 de M. Papa. 2012. Efeito de meios diluentes na viabilidade de sêmen congelado
 1021 bovino. *Veterinária e Zootec.* 19:346–355.
- 1022
- 1023 Camargo, L. S., Freitas-Dell’aqua, C. P., Schmit, R., Guasti, P. N., Volpato, M. S.
 1024 A., Souza, F. F. 2016. New multicolor protocol to assessment dog spermatozoa
 1025 by flow cytometer. Poster abstracts. VI International Symposium on Animal
 1026 Biology of Reproduction, Animal Reproduction.
- 1027
- 1028 Cebrián-Pérez, J. A., A. Casao, M. González-Arto, T. R. Dos Santos Hamilton,
 1029 R. Pérez-Pé, and T. Muiño-Blanco. 2014. Melatonin in sperm biology: Breaking
 1030 paradigms. *Reprod. Domest. Anim.* 49:11–21. doi:10.1111/rda.12378.
- 1031
- 1032 CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame
 1033 andrológico e avaliação de sêmen animal. 2013. 104p.
- 1034
- 1035 Duque C, J. E., B. A. Rojano, and G. Restrepo B. 2017. Criotolerancia de Semen
 1036 Equino Congelado con Aditivos en el Diluyente TT - Cryotolerance of Stallion
 1037 Semen Frozen with Additives in the Extender. *Rev. Investig. Vet. del Perú.*
 1038 28:120–129. doi:10.15381/rivep.v28i1.12944. Available from:
 1039 [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172017000100013&lang=pt%0Ahttp://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v28n1/a13v28n1.pdf)
 1040 [91172017000100013&lang=pt%0Ahttp://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v28n1/a13](http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v28n1/a13v28n1.pdf)
 1041 [v28n1.pdf](http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v28n1/a13v28n1.pdf)
- 1042
- 1043 Gibb, Z., T. J. Butler, L. H. A. Morris, W. M. C. Maxwell, and C. G. Grupen. 2013.
 1044 Quercetin improves the postthaw characteristics of cryopreserved sex-sorted and

1045 nonsorted stallion sperm. Theriogenology. 79:1001–1009.
1046 doi:10.1016/j.theriogenology.2012.06.032. Available from:
1047 <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.06.032>
1048
1049 Harrison, R. A. P., P. J. C. Ashworth, and N. G. A. Miller. 1996. Bicarbonate/CO₂,
1050 an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid
1051 architecture of boar sperm plasma membranes. Mol. Reprod. Dev. 45:378–391.
1052 doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199611)45:3<378::AID-MRD16>3.0.CO;2-V.
1053
1054 Hossain, M. S., A. Johannisson, M. Wallgren, S. Nagy, A. P. Siqueira, and H.
1055 Rodriguez-Martinez. 2011. Flow cytometry for the assessment of animal sperm
1056 integrity and functionality: State of the art. Asian J. Androl. 13:406–419.
1057 doi:10.1038/aja.2011.15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/aja.2011.15>
1058
1059 Leite, P. A., G. G. Schreder, C. L. R. de Almeida, C. E. S. N. Zúccari, and E. V.
1060 da C. e Silva. 2011. Criopreservação do Sêmen Bovino. J. Heal. Sci. 13:279–
1061 286.
1062
1063 Maia, M., and S. Bicudo. 2009. Radicais livres, antioxidantes e função
1064 espermática em mamíferos: uma revisão. Rev. Bras. Reprodução Anim. 33:183–
1065 193.
1066
1067 McNiven, M. A., and G. F. Richardson. 2006. Effect of quercetin on capacitation
1068 status and lipid peroxidation of stallion spermatozoa. Cell Preserv. Technol.
1069 4:169–177. doi:10.1089/cpt.2006.4.169.

1070

1071 Meamar, M., N. Zribi, M. Cambi, L. Tamburrino, S. Marchiani, E. Filimberti, M. G.
1072 Fino, A. Biggeri, Y. Menezo, G. Forti, E. Baldi, and M. Muratori. 2012. Sperm
1073 DNA fragmentation induced by cryopreservation: New insights and effect of a
1074 natural extract from *Opuntia ficus-indica*. *Fertil. Steril.* 98:326–333.
1075 doi:10.1016/j.fertnstert.2012.05.001. Available from:
1076 <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.05.001>

1077

1078 Mortimer, D. 2000. Sperm Preparation Methods. *J. Androl.* 21:357–66.
1079 doi:10.1002/j.1939-4640.2000.tb03390.x.

1080

1081 Nassar, A., M. Mahony, P. Blackmore, M. Morshedi, K. Ozgur, and S. Oehninger.
1082 1998. Increase of intracellular calcium is not a cause of pentoxifylline- induced
1083 hyperactivated motility or acrosome reaction in human sperm. *Fertil. Steril.*
1084 69:748–754. doi:10.1016/S0015-0282(98)00013-2.

1085

1086 Neild, D. M., J. F. H. M. Brouwers, B. Colenbrander, A. Agüero, and B. M.
1087 Gadella. 2005. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh
1088 and frozen thawed stallion spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 72:230–238.
1089 doi:10.1002/mrd.20322.

1090

1091 Patel, H. A., G. M. Siddiquee, D. V. Chaudhari, and V. S. Suthar. 2016. Effect of
1092 different antioxidant additives in semen diluent on cryopreservability (-196°C) of
1093 buffalo semen. *Vet. World.* 9:299–303. doi:10.14202/vetworld.2016.299-303.

1094

- 1095 Ruiz-Pesini, E., C. Diez, A. C. Lapena, A. Perez-Martos, J. Montoya, E. Alvarez,
1096 J. Arenas, and M. J. Lopez-Perez. 1998. Correlation of sperm motility with
1097 mitochondrial enzymatic activities. *Clin. Chem.* 44:1616–1620.
- 1098
- 1099 Santos, D. S. dos, and M. M. F. Rodrigues. 2017. Atividades farmacológicas dos
1100 flavonoides: um estudo de revisão. *Estação Científica (UNIFAP)*. 7:29.
1101 doi:10.18468/estcien.2017v7n3.p29-35.
- 1102
- 1103 Seifi-Jamadi, A., H. Kohram, A. Zare Shahneh, M. Ansari, and B. Macías-García.
1104 2016. Quercetin Ameliorate Motility in Frozen-Thawed Turkmen Stallions Sperm.
1105 *J. Equine Vet. Sci.* 45:73–77. doi:10.1016/j.jevs.2016.06.078. Available from:
1106 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2016.06.078>
- 1107
- 1108 Silva, E. C. B., L. C. P. Arruda, S. V. Silva, H. M. Souza, and M. M. P. Guerra.
1109 2016. High resveratrol or quercetin concentrations reduce the oscillation index of
1110 frozen goat semen. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 68:1237–1243.
1111 doi:10.1590/1678-4162-8670.
- 1112
- 1113 Silva, E. C. B., J. F. P. Cajueiro, S. V. Silva, P. C. Soares, and M. M. P. Guerra.
1114 2012. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of
1115 frozen ram sperm. *Theriogenology*. 77:1722–1726.
1116 doi:10.1016/j.theriogenology.2011.11.023. Available from:
1117 <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.11.023>
- 1118
- 1119 Sunnen, G. V. 1988. Ozone in Medicine: Overview and Future Directions. *J. Adv.*

1120 Med. 1:159–174. Available from:
1121 <http://www.triroc.com/sunnen/topics/ozonemed.htm>
1122
1123 Timm, M., L. Saaby, L. Moesby, and E. W. Hansen. 2013. Considerations
1124 regarding use of solvents in in vitro cell based assays. *Cytotechnology*. 65:887–
1125 894. doi:10.1007/s10616-012-9530-6.
1126
1127 Tironi, S. M. T., A. C. Martinez, F. A. V. Seixas, T. F. Stefanello, C. V. Nakamura,
1128 and G. V. de Moraes. 2019. Effects of treatment with quercetin on the quality of
1129 cryopreserved bovine semen. *Acta Sci. Vet.* 47:1–7. doi:10.22456/1679-
1130 9216.90279.
1131
1132 Tvrdá, E., N. Lukáč, M. Schneidgenová, J. Lukáčová, C. Szabó, Z. Goc, A. Greń,
1133 and P. Massányi. 2013. Impact of Seminal Chemical Elements on the Oxidative
1134 Balance in Bovine Seminal Plasma and Spermatozoa. *J. Vet. Med.* 2013:1–8.
1135 doi:10.1155/2013/125096.
1136
1137 Verstegen, J., M. Iguer-Ouada, and K. Onclin. 2002. Computer Assisted Semen
1138 Analyzers In Andrology Research and Veterinary Practice. *Theriogenology*. 149–
1139 179. doi:10.1016/s0093-691x(01)00664-1.
1140
1141 Vianna, F. P., F. O. Papa, F. S. Zahn, C. M. Melo, and J. A. Dell'Aqua. 2009.
1142 Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for
1143 cryopreserved bull semen. *Anim. Reprod. Sci.* 113:279–282.
1144 doi:10.1016/j.anireprosci.2008.06.009.

1145

1146 Winn, E., and B. D. Whitaker. 2018. Quercetin Supplementation during Boar
1147 Semen Thawing and Incubation Improves Sperm Characteristics. *J. Anim. Sci.*
1148 96:261–262.

1149

1150 Yániz, J. L., S. Vicente-Fiel, S. Capistrós, I. Palacín, and P. Santolaria. 2012.
1151 Automatic evaluation of ram sperm morphometry. *Theriogenology*. 77:1343–
1152 1350. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.10.039. Available from:
1153 <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.10.039>

1154

1155 Zribi, N., N. F. Chakroun, F. Ben Abdallah, H. Elleuch, A. Sellami, J. Gargouri, T.
1156 Rebai, F. Fakhfakh, and L. A. Keskes. 2012. Effect of freezing-thawing process
1157 and quercetin on human sperm survival and DNA integrity. *Cryobiology*. 65:326–
1158 331. doi:10.1016/j.cryobiol.2012.09.003. Available from:
1159 <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.09.003>

1160

1161

1162

Lista de Figuras

1163 Figura 1 - Delineamento experimental (Coleta e criopreservação das amostras) para
1164 análise dos efeitos da quercetina e do ozônio na criopreservação de sêmen bovino.

1165 Figura 2 - Médias para grupo controle e tratamentos com ozônio, sob as variáveis MT e
1166 MP (%) no momento pós-descongelamento (M0). O15 -15 µg/ml de ozônio; O30 - 30
1167 µg/ml de ozônio; O60 - 60 µg/ml de ozônio.

TABELAS

Tabela 1 Sondas Fluorescentes utilizadas para avaliação de viabilidade estrutural celular via citometria de fluxo, com suas respectivas interpretações.

Parâmetro avaliado	Sonda fluorescente	Interpretação
Integridade de membrana plasmática	Iodeto de Propídio (PI; 1,5µM; Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA)	PI positivo= Membrana plasmática lesada (Hossain et al., 2011).
Integridade de membrana acrossomal	Aglutinina de Peanut conjugada com Isotiocionato de fluoresceína (FITC-PNA; 2ng; Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA)	FITC-PNA positivo= Membrana acrossomal reagida (Hossain et al., 2011).
Atividade mitocondrial	MitoStatus Red (MST; 20nM; BD Pharmingen™)	MST positivo= Alto potencial de membrana mitocondrial (Camargo et al., 2016).
Fluidez de membrana	Merocianina (MERO; M24571; 7,5 µM; Life Technologies) associada com a sonda Yo-pro-1 (YO; Y3603; 25nM; Life Technologies)	YO positivo= membrana plasmática lesada; MERO positivo= desordem da bicamada lipídica (Harrison et al., 1996).
Susceptibilidade à lipoperoxidação	C11-BODYPY (PERO; D-3861; Molecular Probes)	PERO positivo= indica que as células estão peroxidando (Neild et al., 2005).

1175 **Tabela 2** Resultados da avaliação de cinética espermática e integridade da estrutura celular para o tratamento controle e os tratamentos com
 1176 quercetina nos momentos pós-descongelamento (M0) e pós-TTR (M30)

VARIÁVEIS	M0					M30				
	CONT	Q25	Q50	Q100	p-valor	CONT	Q25	Q50	Q100	p-valor
MT (%)	55,6±6,9	59,3±5,8	58,7±5,1	62,4±6,3	0,5129	30,4±5,4	33,9±5,3	31,0±5,0	29,4±5,7	0,8749
MP (%)	37,1±5,8	39,5±5,1	37,8±4,6	41,2±4,9	0,691	18,6±4,0	19,6±4,3	17,1±3,9	17,1±4,2	0,8861
VCL (µM/S)	53,6±2,7	54,2±3,2	54,0±3,1	54,8±2,8	0,8304	40,4±3,9	40,3±3,5	37,4±3,1	38,5±3,6	0,6909
LIN (%)	61,2±1,4	61,7±2,2	60,0±2,3	59,5±2,3	0,7559	53,9±4,9	52,7±3,9	51,5±4,1	49,7±4,8	0,6132
ALH (µM)	2,2±0,1	2,2±0,0	2,3±0,1	2,3±0,1	0,4971	1,8±0,2	1,9±0,2	1,9±0,1	1,9±0,2	0,6814
PI-PNA- (%)	55,2±3,7	58,0±4,7	54,3±4,6	57,6±5,4	0,7911	35,8±4,7	46,4±5,8	40,2±5,1	43,2±4,5	0,2234
PI-MST+ (%)	12,1±5,0	14,7±6,4	11,9±5,4	9,1±4,5	0,9782	5,5±2,2	7,4±3,0	3,8±1,6	1,6±0,8	0,6512
YO-MERO- (%)	22,5±5,8	12,4±6,2	36,0±8,2	34,5±8,8	0,548	18,7±6,2	24,6±7,0	28,4±8,0	28,3±9,1	0,3491
PERO (%)	21,9±3,2	21,0±4,3	22,4±3,6	26,9±3,9	0,7274	18,4±3,8	11,7±2,6	17,0±3,4	16,3±3,5	0,3864

1177 *Médias±erros padrões das variáveis: MT - motilidade total; MP - motilidade progressiva; VCL - velocidade curvilinear; LIN – linearidade; ALH - amplitude de*
 1178 *deslocamento lateral de cabeça; PI-PNA- - membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal íntegra; PI-MST+ - membrana plasmática íntegra com alto*
 1179 *potencial mitocondrial; YO-MERO- - membrana íntegra e bicamada organizada; PERO – porcentagem de células peroxidadas; CONT - controle; Q25 - 25 µg/ml*
 1180 *de quercetina; Q50 - 50 µg/ml de quercetina; Q100 - 100 µg/ml de quercetina.*

1181
1182

1183

1184 **Tabela 3** Resultados da avaliação de cinética espermática e integridade da estrutura celular para o tratamento controle e os tratamentos com
 1185 ozônio nos momentos pós-descongelamento (M0) e pós-TTR (M30)

VARIÁVEIS	M0					M30				
	CONT	O15	O30	O60	p-valor	CONT	O15	O30	O60	p-valor
MT (%)	55,6±6,8 ^a	28,5±5,6 ^b	19,9±3,3 ^b	16,5±2,7 ^b	<0,0001	30,4±5,4 ^a	14,8±4,0 ^b	7,2±2,0 ^b	7,2±1,1 ^b	<0,0001
MP (%)	37,1±5,8 ^a	8,9±4,7 ^b	3,3±1,7 ^b	1,1±0,5 ^b	<0,0001	18,6±4,0 ^a	3,1±2,9 ^b	0,3±0,2 ^b	0,2±0,1 ^b	<0,0001
VCL (µM/S)	53,6±2,7 ^a	23,4±3,2 ^b	19,5±1,8 ^b	17,2±1,1 ^b	<0,0001	40,3±3,9 ^a	18,1±2,6 ^b	14,4±1,1 ^b	15,1±0,6 ^b	<0,0001
LIN (%)	61,2±1,4 ^a	30,7±3,4 ^b	26,5±2,9 ^b	19,9±2,0 ^b	<0,0001	53,9±4,9 ^a	16,6±4,0 ^b	15,7±1,9 ^b	13,0±1,1 ^b	<0,0001
ALH (µM)	2,2±0,1 ^a	1,4±0,2 ^b	0,9±0,2 ^b	0,7±0,2 ^b	<0,0001	1,8±0,2 ^a	0,4±0,2 ^b	0,3±0,2 ^b	0,2±0,1 ^b	<0,0001
PI-PNA- (%)	55,2±3,7	51,8±5,3	50,0±5,3	43,1±4,1	0,2019	35,8±4,7	31,7±4,1	26,9±4,5	24,9±4,1	0,1091
PI-MST+ (%)	12,1±5,0	5,5±2,4	3,7±2,2	6,7±2,8	0,0798	5,5±2,2 ^a	2,8±1,5 ^b	2,1±1,1 ^b	0,3±0,2 ^b	0,0334
YO-MERO- (%)	22,5±5,8	25,4±6,2	24,4±6,3	26,5±6,3	0,6804	18,7±6,2	12,9±3,9	16,2±5,2	12,9±4,2	0,4128
PERO (%)	21,9±3,2	31,6±3,8	21,4±3,8	26,4±5,2	0,3373	18,4±3,8	12,6±3,2	17,8±6,3	12,8±6,2	0,4989

1186 *Médias±erros padrões das variáveis: MT - motilidade total; MP - motilidade progressiva; VCL - velocidade curvilinear; LIN – linearidade; ALH - amplitude de*
 1187 *deslocamento lateral de cabeça; PI-PNA- - membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal íntegra; PI-MST+ - membrana plasmática íntegra com alto*
 1188 *potencial mitocondrial; YO-MERO- - membrana íntegra e bicamada organizada; PERO – porcentagem de células peroxidadas; CONT - controle; O15 -15 µg/ml*
 1189 *de ozônio; O30 - 30 µg/ml de ozônio; O60 - 60 µg/ml de ozônio. Variáveis com a mesma letra, na mesma linha e período (M0 ou M30) indicam mesmo resultado*
 1190 *estatístico.*

FIGURAS

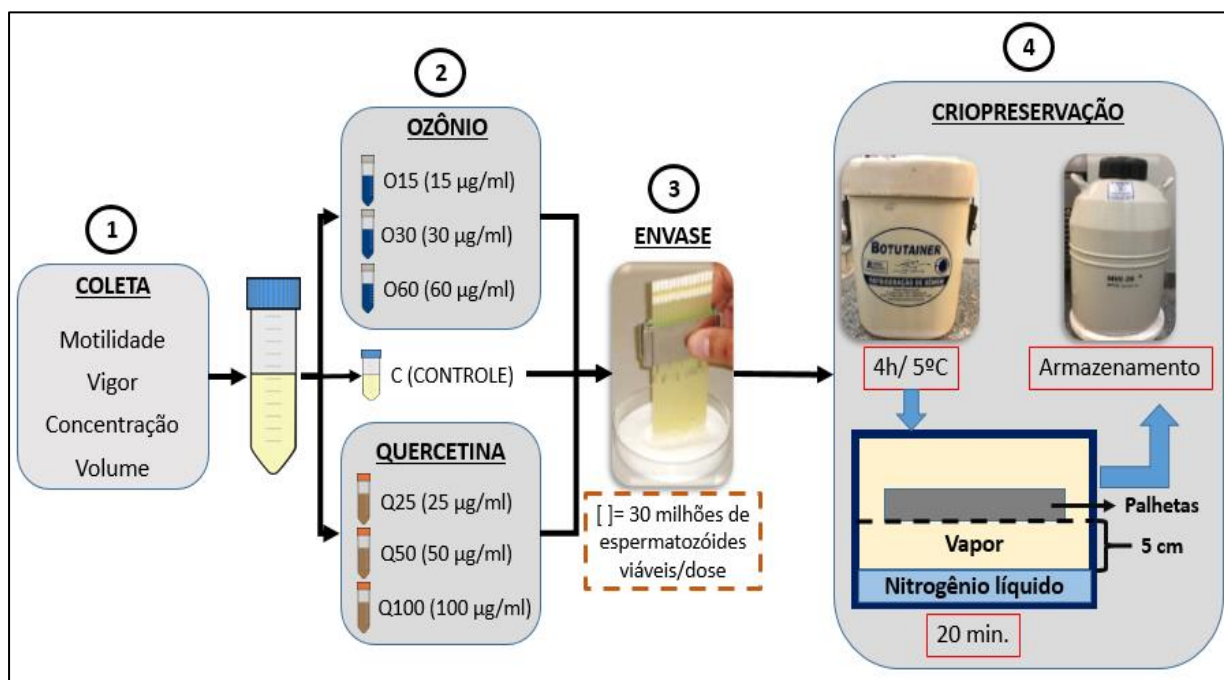
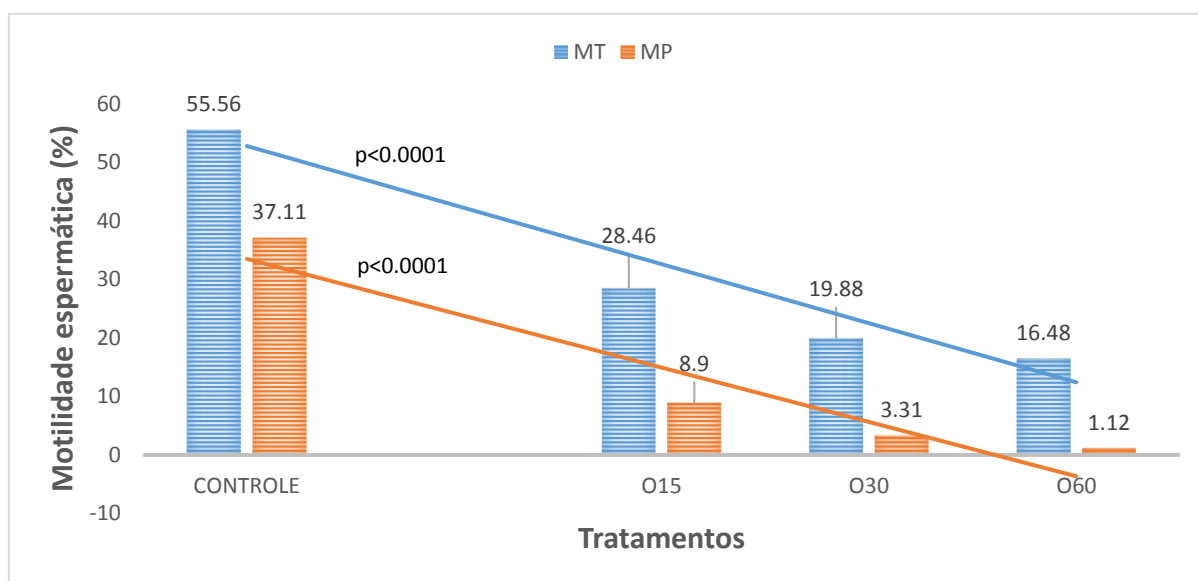


Figura 1 Delineamento experimental (Coleta e criopreservação das amostras) para análise dos efeitos da quercetina e do ozônio na criopreservação de sêmen bovino.

1193



1194

1195

1196 *Figura 2 Médias para grupo controle e tratamentos com ozônio, sob as variáveis MT e*
 1197 *MP (%) no momento pós-descongelamento (M0). O15 -15 µg/ml de ozônio; O30 - 30*
µg/ml de ozônio; O60 - 60 µg/ml de ozônio

1198 **ANEXO I –** Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

1199



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Efeitos de diferentes aditivos antioxidantes na criopreservação de sêmen de bovinos”, registrada com o nº 1.082/2019, sob a responsabilidade de **Eliane Vianna da Costa e Silva** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 7ª reunião ordinária do dia 26/09/2019.

FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	02/09/2019 a 28/02/2020
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Bos indicus</i> / Nelore
Nº de animais	5
Peso/Idade	450 kg / Adulto
Sexo	Machos
Origem	Fazenda Escola / FAMEZ

Fábio José Carvalho Faria
Coordenador da CEUA/UFMS
Campo Grande, 30 de setembro de 2019.

ANEXO II – Normas para submissão de artigo

ANIMAL SCIENCE JOURNAL

Geral:

- As submissões devem ter espaço duplo.
- Todas as margens devem ter pelo menos 30 mm.
- Todas as páginas devem ser numeradas consecutivamente no canto superior direito, começando com a página de título.
- Os números de linha devem ser adicionados em todas as páginas na margem esquerda.
- Não use enter no final das linhas dentro de um parágrafo.
- Desative a opção de hifenização; inclua apenas os hífenessenciais ao significado.
- Especifique qualquer caractere especial usado para representar caracteres que não sejam do teclado.
- Tome cuidado para não usar l (capital L minúsculo) para 1 (um), O (capital o) para 0 (zero) ou ß (esszett alemão) para β (beta grego).
- Use uma guia, não espaços, para separar os pontos de dados nas tabelas. Se você usar uma função de editor de tabela, verifique se cada ponto de dados está contido em uma célula exclusiva (ou seja, não use retornos de carro nas células).

Folha de rosto:

A página de rosto deve conter (i) o título do trabalho, (ii) os nomes completos dos autores e (iii) os endereços das instituições em que o trabalho foi realizado, juntamente com (iv) o endereço postal e de email completo do autor a quem a correspondência sobre o manuscrito deve ser enviada. O endereço atual de qualquer autor, se diferente do local onde o trabalho foi realizado, deve ser fornecido em nota de rodapé. O título deve ser curto, informativo e conter as principais palavras-chave. Não use abreviações no título.

Resumo e palavras-chave:

Todos os artigos devem ter um resumo estruturado que indique em 200 palavras ou menos o objetivo, procedimentos básicos, principais conclusões e principais conclusões do estudo. Cinco ou menos palavras-chave (para fins de indexação) devem ser fornecidas abaixo do resumo.

Texto:

Os autores devem usar os seguintes subtítulos para dividir as seções do manuscrito: introdução, materiais e métodos, resultados e discussão.

Agradecimentos:

A fonte de subsídios financeiros e outros fundos deve ser reconhecida, incluindo uma declaração franca dos links e afiliações industriais dos autores. A contribuição de colegas ou instituições também deve ser reconhecida. Agradecimentos pessoais e agradecimentos a revisores anônimos não são adequados.

Referências:

No texto, as citações devem seguir o método data do autor, pelo qual o sobrenome do autor e o ano de publicação da fonte devem aparecer no texto, por exemplo (jones, 1998). A lista completa de referências deve aparecer em ordem alfabética por nome no final do artigo.

Uma amostra das entradas mais comuns nas listas de referência é exibida abaixo. Observe que um doi deve ser fornecido para todas as referências, quando disponíveis. Consulte o estilo de referência apa de wiley para obter mais informações. Observe que, para artigos de periódicos, os números das edições não são incluídos, a menos que cada edição do volume comece com a página um.

Exemplo de referência com 2 a 7 autores:

Beers, S. R. , & De Bellis, M. D. (2002). Neuropsychological function in children with maltreatment-related posttraumatic stress disorder. *The American Journal of Psychiatry*, 159, 483–486. <https://doi:10.1176/appi.ajp.159.3.483>

Ramus, F., Rosen, S., Dakin, S. C., Day, B. L., Castellote, J. M., White, S., & Frith, U. (2003). Theories of developmental dyslexia: Insights from a multiple

case study of dyslexic adults. *Brain*, 126(4), 841–865. <https://doi:10.1093/brain/awg076>

Exemplo de referência com mais de 7 autores:

Rutter, M., Caspi, A., Fergusson, D., Horwood, L. J., Goodman, R., Maughan, B., ... Carroll, J. (2004). Sex differences in developmental reading disability: New findings from 4 epidemiological studies. *Journal of the American Medical Association*, 291(16), 2007–2012. [https://doi: 10.1001/jama.291.16.2007](https://doi:10.1001/jama.291.16.2007)

Edição de livro:

Bradley-Johnson, S. (1994). *Psychoeducational assessment of students who are visually impaired or blind: Infancy through high school (2nd ed.)*. Austin, TX: Pro-ed.

Para um capítulo em um livro ou uma entrada em um livro de referência, use os seguintes formatos:

Autor, A. A. e Autor, B. B. (1995). Título do capítulo ou entrada. Em A. Editor, B. Editor e C. Editor (Eds.), *Título do livro* (pp. Xxx-xxx). Local: Publisher.

Autor, A. A. e Autor, B. B. (1993). Título do capítulo ou entrada. Em A. Editor e B. Editor (Eds.), *Título do livro* (pp. Xxx-xxx). Disponível em <http://www.xxxxxxxxxxx> Autor, A. A. e Autor, B. B. (1995). Título do capítulo ou entrada. Em A. Editor, B. Editor e C. Editor (Eds.), *Título do livro* (pp. Xxx-xxx). doi: xxxxxxxxxxxx

Livro inteiro, versão impressa:

Shotton, M. A. (1989). *Computer addiction? A study of computer dependency*. London, England: Taylor & Francis.

Versão eletrônica de um livro impresso:

Shotton, M. A. (1989). *Computer addiction? A study of computer dependency [DX Reader version]*. Retrieved from <http://ebookstore.tandf.co.uk/html/index.asp> Schiraldi, G. R. (2001). *The post-*

traumatic stress disorder sourcebook: A guide to healing, recovery, and growth
[Adobe Digital Editions version]. doi:10.1036/0071393722

Livro somente eletrônico:

O'Keefe, E. (n.d). Egoism & the crisis in Western values. Retrieved from
<http://www.onlineoriginals.com/showitem.asp?itemID=135>

Versão eletrônica de um livro republicado:

Freud, S. (1953). The method of interpreting dreams: An analysis of a specimen
dream. In J. Strachey (Ed. & Trans.), The standard edition of the completed
psychological works of Sigmund Freud (Vol. 4, pp. 96-121). Retrieved from
<http://books.google/books> (Original work published 1900)

Patentes:

No texto, forneça a patente e a data de emissão (não a data do pedido)
da patente. Na entrada da lista de referências, inclua o (s) investidor (es) para
quem a patente foi emitida e a fonte oficial da qual as informações da patente
podem ser recuperadas.

Entrada na lista de referências: Smith, I. M. (1988). U.S. Patent No.
123,445. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Artigo original ainda não publicado em um estilo de edição:

Um artigo on-line que ainda não foi publicado em uma edição (portanto,
não possui números de volume, edição ou página) pode ser citado pelo seu
Digital Object Identifier (DOI). O DOI permanecerá válido e permitirá que um
artigo seja rastreado mesmo após sua alocação. Abe H, Takeuchi H. 2012.
Characterization of the intronic VNTR polymorphisms found in a paralog of
chicken serotonin transporter gene. Animal Science Journal. 2012, doi:
10.1111/asj.12011

Material eletrônico:

National Center for Biotechnology Information (NCBI). 1999. Nucleotide–
nucleotide BLAST (blastn) [homepage on the Internet]. National Center for

Biotechnology Information, Bethesda, MD; [cited 13 December 2002]. Available from URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Ph.D. Tese:

Suzuki, Y. 2016. Study on the physiological functions of two endocrine factors derived from the liver, ANGPTL8 and Chemerin, in Ruminants. Ph.D. Thesis, Tohoku University, Sendai, Japan

Tabelas:

As tabelas devem ser independentes e complementar, mas não duplicar, as informações contidas no texto. Numere tabelas consecutivamente no texto em algarismos arábicos. Digite tabelas em uma página separada com a legenda acima. As legendas devem ser concisas, mas abrangentes - a tabela, a legenda e as notas de rodapé devem ser compreensíveis sem referência ao texto. Linhas verticais não devem ser usadas para separar colunas. Os cabeçalhos das colunas devem ser breves, com unidades de medida entre parênteses; todas as abreviações devem ser definidas nas notas de rodapé. Símbolos de nota de rodapé: †, ‡, §, ¶, devem ser usados (nessa ordem) e *, **, *** devem ser reservados para os valores de P. Medidas estatísticas como SD ou SEM devem ser identificadas nos títulos.

Figuras:

As figuras coloridas não são cobradas pela publicação em vigor desde 1 de janeiro de 2013. Todas as ilustrações (desenhos e fotografias) são classificadas como figuras. As figuras devem ser citadas em ordem consecutiva no texto. As figuras devem ser dimensionadas para caber na coluna (80,5 mm), intermediária (112 mm) ou na largura do texto completo (168 mm). As ampliações devem ser indicadas usando uma barra de escala na ilustração.

Os números das linhas devem ser gráficos ou diagramas nítidos em preto e branco, desenhados profissionalmente ou com um pacote de gráficos de computador. As letras devem ser incluídas e devem ser dimensionadas para não serem maiores que o texto do diário.

1367 **Legendas das figuras:**

1368 Digite legendas de figuras em uma página separada. As legendas
1369 devem ser concisas, mas abrangentes - a figura e sua legenda devem ser
1370 compreensíveis sem referência ao texto. Inclua definições de quaisquer
1371 símbolos usados e defina / explique todas as abreviações e unidades de
1372 medida.