

CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DA QUERCETINA NA QUALIDADE SEMINAL DE BOVINOS

TIRONI, Stella Maris Teobaldo¹, GOMES, Débora Senise²; MARTINEZ, Antonio Campanha³

¹Mestranda do Programa de Pós-graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal da Universidade Estadual de Maringá - Campus Umuarama/PR

²Aluna do Programa de Pós-graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal da Universidade Estadual de Maringá - Campus Umuarama/PR

³Professor Adjunto da Universidade Estadual de Maringá - Campus Umuarama/PR

Palavras chave: avaliação espermática; estresse oxidativo; EROs; plasma seminal; ruminantes.

Introdução

As biotecnologias da reprodução animal possuem grande importância para o desenvolvimento do melhoramento genético. Através delas, é possível obter maior número de progênie em menor tempo, otimizando assim, a vida reprodutiva de animais zootecnicamente superiores (FREITAS, 2015).

Durante o processo de congelamento, os efeitos negativos do estresse oxidativo ocorrem tanto pela retirada da maior parte do plasma seminal, que possui grande capacidade antioxidante (BUSTAMANTE et al., 2006), quanto pelo estímulo à produção de EROs, que ocorre durante a criopreservação (WATSON, 2000).

Para otimização dessas biotecnologias, grande parte do sêmen de touros que é utilizado na reprodução é congelado. Entretanto, sabe-se que a criopreservação é um procedimento reconhecidamente deletério para as células espermáticas por reduzir sua sobrevivência e, conseqüentemente, seu potencial fertilizante (YESTE et al., 2014).

Por esse motivo, os danos moleculares, resultantes do congelamento de sêmen, têm sido bastante estudado (PEÑA et al., 2011).

Dentre os parâmetros espermáticos estudados, estão a permeabilidade de membrana, a desorganização da bicamada lipídica e a concentrações intracelulares de cálcio, que apresentam diferenças pré e pós congelamento (YESTE et al., 2014). Além disso, o estresse oxidativo diminui a fertilidade espermática, bem como prejudica a capacidade desses espermatozoides em gerar embriões viáveis (AITKEN et al., 2010).

Para obtenção de sucesso na criopreservação é preciso uma boa realização de um conjunto de fatores. Isso inclui o crioprotetor utilizado, o tipo de diluidor, como é realizada a curva de resfriamento e descongelamento, além do tipo de envase (CLULOW et al., 2008).

Um congelamento é considerado satisfatório quando o espermatozoide mantém sua capacidade fertilizante após o descongelamento e, para isso, o espermatozoide precisa ser capaz de manter a produção de energia via metabolismo, manter a sua configuração normal e a integridade da membrana plasmática, manter sua motilidade e a integridade acrossomal (LEMMA, 2011).

A disfunção de qualquer uma dessas funções ou habilidades pode afetar significativamente a capacidade de fertilização do espermatozoide. Geralmente, a causa dessas disfunções está atribuída à formação de cristais de gelo e o movimento de água resultante do gradiente osmótico originado durante o procedimento de congelamento (LEMMA, 2011).

O espermatozoide possui sua defesa celular escassa e deficiente. Essa deficiência pode ser explicada pela remoção do citoplasma e de várias organelas do espermatozoide, deixando o espermatozoide mais vulnerável ao estresse oxidativo, uma vez que as enzimas antioxidantes ficam armazenadas no citoplasma celular (AITKEN et al., 2014).

A célula espermática sempre está em condições de aerobiose, portanto, é normal que produzam radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROs), resultantes da atividade metabólica normal (LAMIRANDE et

al., 1997). Geralmente, a geração dos radicais livres ocorre nas mitocôndrias, membranas celulares e citoplasma (BARBOSA et al., 2010).

Levando em conta essa deficiência, o plasma seminal possui importante papel de aumentar a sua proteção, contendo altas concentração e variedade de antioxidantes em sua composição (BARBOSA et al., 2010).

Considerando o exposto, o objetivo desta revisão bibliográfica é elucidar sobre o estresse oxidativo e o que ele acarreta às células espermáticas, a ação dos antioxidantes, quando utilizado em diluidores de sêmen, bem como discorrer sobre a quercetina e suas características na melhoria da qualidade seminal de bovinos.

Estresse oxidativo

Quando em concentrações fisiológicas, as espécies reativas de oxigênio (EROs) participam de processos vitais dos espermatozoides como maturação, capacitação e hiperativação espermáticas, reação acrossomal e fusão espermio-oocitária (SAALU, 2010).

Durante o processo de capacitação espermática, os níveis de cálcio intracelular aumentar, bem como as EROs e a tirosina quinase, originando o aumento também na produção da adenosina monofosfato cíclica (AMPC). Estes eventos, somados, induzem o espermatozoide a um estado de hiperativação. Sendo assim, nestas condições, o espermatozoide passa pelo processo de reação acrossomal fisiológica, adquirindo, então, a habilidade de fecundar (SAALU, 2010).

Entretanto, quando a sua produção excede a capacidade de defesa antioxidante da célula, instala-se o estresse oxidativo, caracterizado por peroxidação da membrana espermática. Além disso, o processo de lipoperoxidação (LPO) induz danos importantes ao DNA celular e apoptose de espermatozoides (KOTHARI et al., 2010; GUTHRIE & WELCH, 2012).

As EROs que geram maiores efeitos na função reprodutiva dos animais e na fertilização são o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila ($OH^\cdot$), altamente reativo, e o radical peroxila ($ROO^\cdot$) (MANEESH e JAYALEKSHMI, 2006).

A lipoperoxidação (LPO) é um outro estresse oxidativo que ocorre no espermatozoide em situações de desequilíbrio oxidativo. Portanto, a LPO é desencadeada quando as EROs sobrecarregam o sistema antioxidante de defesa, podendo comprometer os espermatozoides e, por consequência, a fertilidade do sêmen (SANOCKA & KURPISZ, 2004).

O espermatozoide de mamíferos é altamente sensível aos efeitos da LPO devido a uma alta concentração de lipídeos poli-insaturados na composição de sua membrana plasmática (SANOCKA & KURPISZ, 2004).

É importante lembrar que a origem de radicais livres acontece, geralmente, nas mitocôndrias, membranas celulares e citoplasma (Barbosa et al., 2010), e pode ser favorecida pela presença de íons ferro e cobre (KOURY & DONANGELO, 2003). Entretanto, a principal fonte geradora de radicais livres é a mitocôndria, através da cadeia de transporte de elétrons (GREEN et al., 2004).

Antioxidantes no sêmen de bovinos

O espermatozoide é uma célula altamente especializada, que possui como principal função fertilizar e transferir o material genético masculino. Ao seu redor, ele está completamente envolto por uma membrana e dividido em quatro compartimentos, são eles: acrossoma, cabeça, peça intermediária e flagelo, expostos na figura 1, em que cada estrutura desempenha um papel importante para o funcionamento da célula espermática (VARNER et al., 2015).

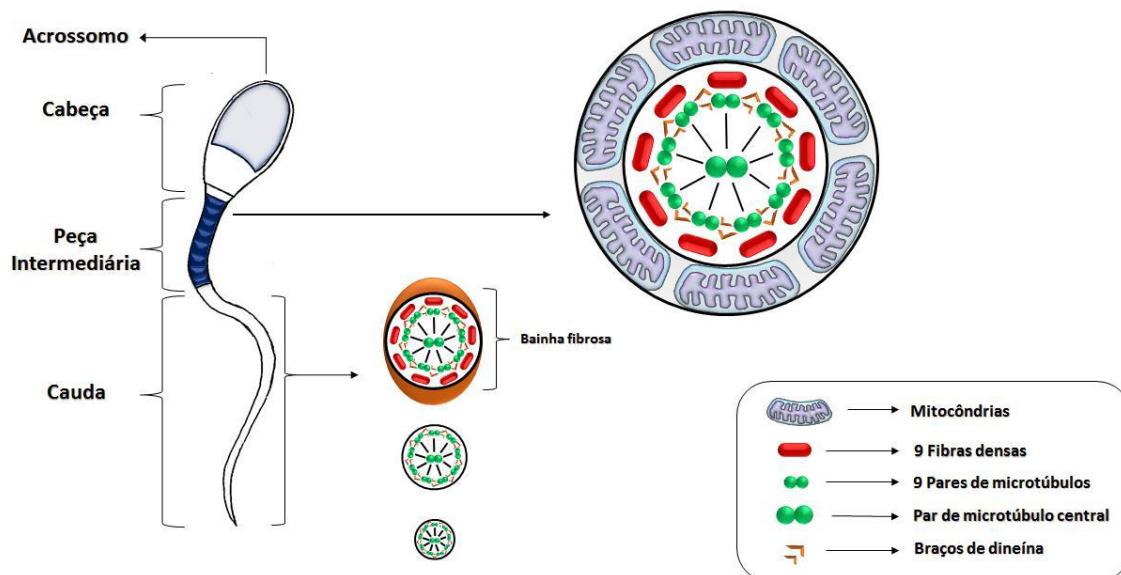


Figura 1. Estrutura e componentes do espermatozoide (SILVA, 2016).

O metabolismo aeróbico espermático está associado com a geração de moléculas pró-oxidantes, as EROs. Sendo assim, a homeostase intracelular é mantida através de uma complexa interação entre EROs e antioxidantes (AGARWAL et al., 2006).

As substâncias antioxidantes são moléculas enzimáticas ou não enzimáticas, capazes de prevenir, interceptar ou reparar a ação dos agentes oxidantes, transformando-os em água, e protegendo as células e também o organismo dos efeitos nocivos ocasionados pela superprodução de EROs (LUZ et al., 2011).

No caso do plasma seminal, os antioxidantes exercem importantes funções, tais como: proteger os espermatozoides das EROs originadas de espermatozoides anormais; eliminar EROs geradas por leucócitos; prevenir a fragmentação do DNA; reduzir as crio-injúrias e bloquear a maturação espermática prematura (AGARWAL et al. 2008).

Com o objetivo de aprimorar a qualidade espermática do sêmen criopreservado, através da prevenção ou redução do processo peroxidativo, diversos pesquisadores têm se dedicado a realizar estudos relacionados à adição de antioxidantes nos diluidores seminais das diversas espécies (CÂMARA et al., 2011; SILVA et al., 2011; SILVA, et al., 2012). Sendo assim, os antioxidantes possuem a responsabilidade de inibir e/ou reduzir os danos causados pelas EROs (AITKEN et al., 2014).

Os antioxidantes enzimáticos também são chamados de agentes naturais. Eles são o primeiro sistema de defesa a atuar no organismo, neutralizando o excedente de EROs e prevenindo os danos que seriam causados à estrutura celular. São exemplos de antioxidantes naturais: a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (LUZ et al., 2011).

Os resultados dos estudos têm revelado a eficácia da utilização de antioxidantes, assim como, seus efeitos deletérios. A justificativa parece estar relacionada com a dose adicionada ao meio diluidor, pois antioxidantes em excesso também podem ser prejudiciais, podendo, inclusive, prejudicar fases fisiológicas importantes como a capacitação espermática (SAVI et al, 2015).

Quercetina

A quercetina é um flavonoide do grupo dos compostos polifenólicos, sendo amplamente encontrado nas frutas, vegetais, grãos, flores, com elevada concentração no vinho tinto. Deste modo, a quercetina é classificada como um antioxidante natural não enzimático (LIU et al., 2010).

A quercetina possui uma estrutura considerada ideal para a redução do estresse oxidativo, pois possui vários grupos de hidroxilas e, assim, se torna mais potente que as vitaminas E e C (BARREIROS et al., 2006). Isso pode ser explicado, pela grande quantidade de grupos hidroxila presentes na estrutura da quercetina (BARREIROS et al., 2006), sendo demonstrada sua capacidade em inibir danos oxidativos induzidos pelo H₂O₂ (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

Além disso, a quercetina possui capacidade inibidora sobre a peroxidação lipídica, similar e sinérgica ao resveratrol, um polifenol não flavonoide (STOJANOVIC, 2001).

Gibb et al. (2013) utilizaram a quercetina com objetivo de neutralizar a formação excessiva de EROs decorrente do processo de criopreservação e sexagem do sêmen de garanhões. Como resultado, eles observaram a redução dos índices de fragmentação de DNA no sêmen criopreservado sexado e aumento significativo da motilidade e capacidade de interação entre espermatozoide-oócito do sêmen criopreservado não sexado.

Em outro estudo realizado por Zribi et al. (2012) com sêmen humano, a adição de quercetina ao diluente seminal aumentou a motilidade e viabilidade espermática, reduziu a fragmentação do DNA e a oxidação após descongelamento do sêmen.

Em outro estudo, adicionando a quercetina ao diluente Tris-gema de ovo-glicerol, Silva et al. (2012) não observaram diferença ($P < 0,05$) entre os grupos quando avaliada a motilidade progressiva, vigor, acrossoma e membranas íntegras. Entretanto, no grupo suplementado com 5 µg/mL de quercetina, a porcentagem de gametas com alto potencial de membrana mitocondrial foi maior ($P < 0,05$) do que naqueles tratados com 10, 15 ou 20 µg/mL de quercetina.

Conclusões

Diante do exposto conclui-se que as EROs participam de importantes processos fisiológicos como a capacitação espermática, reação acrossomal e a fusão entre gametas. Os sistemas orgânicos contam com a participação dos antioxidantes para manter o equilíbrio, através da neutralização ou atenuação desses radicais livres. Contudo, quando sua produção é excessiva há sobrecarga do sistema antioxidante de defesa celular. Com isso ocorre o estresse oxidativo, que tem como consequência a lipoperoxidação das membranas espermáticas, um processo altamente deletério para os espermatozoides.

Buscando solucionar esse problema, estudos têm avaliado os efeitos da adição de agentes antioxidantes enzimáticos e não enzimático ao sêmen, tanto pré-congelação quanto pós-descongelação. O resultado da utilização de quercetina é bastante satisfatório, já que as células submetidas à criopreservação sofrem potencialmente muitos danos, em especial, fragmentação de DNA. Além disso, a suplementação de pequenas quantidades de quercetina em meio diluidor Tris Gema Glicerol reduz o potencial mitocondrial das células espermáticas pós-congelação/descongelação.

Referências bibliográficas

- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SIKKA, S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v.18, p.325-332, 2006.
- AGARWAL, A.; MAKKER, K.; SHARMA, R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: An update. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.59, p.2-11, 2008.
- AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N.; FINNIE, J. M.; HEDGES, A.; MCLACHLAN, R. I. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. **Human Reproduction**, v. 25, p. 2415–2426. 2010.
- AITKEN, R. J.; LAMBOURNE, S.; GIBB, Z. The John Hughes Memorial Lecture: Aspects of Sperm Physiology Oxidative Stress and the Functionality of Stallion Spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.34, p.17–27, 2014.
- BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v.23, n.4, p.629-643, 2010.

- BARREIROS, A.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v.29, n.1, 2006.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
- BUSTAMANTE FILHO, I. C.; PEDERZOLLI, A. M.; SGARAVATTI, A. M.; MATTOS, R. C.; DUTRA FILHO, C. S.; JOBIM, M. I. M. Activity of glutathione peroxidase and catalase in stallion semen during cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 70-73, 2006.
- CÂMARA, D.R.; SILVA, S.V.; ALMEIDA, F.C.; NUNES, J.F.; GUERRA, M.M. Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozenthawed ram semen. **Theriogenology**, v. 76, p. 342-350, 2011.
- CLULOW, J. R.; MANSFIELD, L. J.; MORRIS, L. H. A.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 108, p. 298-308, 2008.
- FREITAS, B. W. **Efeito de diferentes crioprotetores e aditivos no diluente sobre a qualidade seminal de garanhões da raça Mangalarga Marchador**. Tese (Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2015.
- GIBB, Z.; BUTLER, T.J.; MORRIS, L.H.A.; MAXWELL, W.M.C.; RUPEN, C.G. Quercetin improves the post thaw characteristics of cryopreserved sex-sorted and nonsorted stallion sperm. **Theriogenology**, v.79, p.1001- 1009, 2013.
- GREEN, K.; BRAND, M.D.; MURPHY, M.P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v.53, suppl.1, p.110-118, 2004.
- GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Effects of reactive oxygen species on sperm function. **Theriogenology**, v. 78, p. 1700-1708, 2012.
- KOTHARI, S.; THOMPSON, A.; AGARWAL, A.; PLESSES, S.S. Free radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm functions. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.48, p.425-435, 2010.
- KOURY, J.C.; DONANGELO, C.M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, v.16, n.4, p.433-441, 2003.
- LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v.2, p. 48-54, 1997.
- LEMMA, A. Effect of Cryopreservation on Sperm Quality and Fertility. In: MANAFI, M. (Ed.) **Artificial Insemination in Farm Animals**, InTech, p. 191-216, 2011.
- LIU, S.; HOU, W.; YAO, P. et al. Quercetin protects against ethanol-induced oxidative damage in rat primary hepatocytes. **Toxicol. In vitro**, v.24, p.516-522, 2010.
- LUZ, H.K.M.; WANDERLEY, L.S.; FAUSTINO, L.R.; SILVA, C.M.G.; FIGUEREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, n.2, p.956-969, 2011.
- MANEESH, M.; JAYALEKSHMI, H. Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 21, p. 80-89, 2006.
- PEÑA, F. J.; GARCÍA, B. M.; SAMPER, J. C.; APARICIO, I. M.; TAPIA, J. A.; FERRUSOLA, C. O. Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: the way to improve current cryopreservation protocols? **Theriogenology**, v. 76, p. 1177-1186, 2011.
- 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.
- SANOCKA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.2, p.12-19, 2004.
- SAVI, P. A. P.; ZAVAREZ, L. B.; KIPPER, B. H.; FELICIANO, M. A. R.; VICENTE, W. R. R.; OLIVEIRA, M. E. F. Uso de antioxidantes em meios diluidores para sêmen ovino: revisão de literatura. **Ars Veterinária**, v.31, n.1, p.012-018, 2015.
- SILVA, E. C.; CAJUEIRO, J. F.; SILVA, S. V.; SOARES, P. C.; GUERRA, M. M. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. **Theriogenology**, v.77, n.8, p.1722-1726, 2012.

- SILVA, L. F. M. C. **Estudo sobre a redução do estresse oxidativo em sêmen equino a partir da adição de quercetina nos diluentes de refrigeração e congelamento.** Botucatu - SP. 2016, 94p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2016.
- 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, p.370-384. 2011.
- STOJANOVIC, S.; SPRINZ, H.; BREDE, O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 391, p. 79-89. 2001.
- VARNER, D. D.; GIBB, Z.; AITKEN, R. J. Stallion fertility: a focus on the spermatozoon. **Equine Veterinary Journal**, v.47, p.16-24, 2015.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 481-492, 2000.
- YESTE, M.; ESTRADA, E.; ROCHA, L. G.; MARÍN, H.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; MIRÓ, J. Cryotolerance of stallion spermatozoa is related to ROS production and mitochondrial membrane potential rather than to the integrity of sperm nucleus. **Andrology**, v.2, p. 1-13, 2014.
- ZRIBI, N.; CHAKROUN, N. F.; ABDALLAH, F. B.; ELLEUCH, H.; SELLAMI, A.; GARGOURI, J.; REBAI, T.; FAKHFAKH, F.; KESKES, L. A. Effect of freezingthawing process and quercetin on human sperm survival and DNA integrity. **Cryobiology**, v. 65, p. 326-331, 2012.