

Avaliação *in vitro* do sêmen congelado de carneiros com diluidor suplementado com miricetina

[*In vitro* evaluation of ram sperm frozen with extender supplemented with myricetin]

L.C.P. Arruda¹, R.A.J. Araújo Silva¹, M.M. Monteiro¹, R.P.F. Silva², A.S. Oliveira¹,
F.C.C. Mergulhão¹, P.L.J. Monteiro Jr³, A.M. Batista¹, M.M.P. Guerra¹

¹Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE

²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE

³Departamento de Ciência Animal, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação do diluidor de congelamento de sêmen ovino com o flavonoide miricetina contra os danos ocasionados aos espermatozoides. Oito *pools* de sêmen, obtidos de quatro reprodutores ovinos, foram congelados com diferentes concentrações de miricetina (0, 1, 10, 100 e 1000nM). Após o descongelamento, o sêmen foi avaliado quanto à cinética espermática, à integridade das membranas plasmática e acrossomal, ao potencial de membrana mitocondrial, aos níveis de ROS intracelular, à peroxidação lipídica e à estabilidade de membrana. Amostras tratadas com miricetina 10nM apresentaram menor percentual de células rápidas ($P \leq 0,05$), quando comparadas ao grupo miricetina 1000nM. Amostras do grupo controle apresentaram maior ($P \leq 0,05$) VAP que o grupo 10nM de miricetina, enquanto amostras criopreservadas com miricetina (10, 100 e 1000nM) evidenciaram maior ($P < 0,05$) BCF, quando comparadas ao grupo controle. O grupo tratado com miricetina 1000nM apresentou maior percentual ($P < 0,05$) de células com peroxidação lipídica, quando comparado ao grupo controle. Em conclusão, a suplementação do diluidor de criopreservação de sêmen ovino com 10 e 100nM de miricetina afeta a cinética espermática sem provocar alterações na estrutura geral do gameta, enquanto 1000nM de miricetina provoca mudanças na cinética associadas à danos peroxidativos.

Palavras-chave: ovinos, antioxidantes, flavonoides, criopreservação

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of the supplementation of ram semen frozen with extender with the flavonoid myricetin against damage to sperm. Eight pools of semen obtained from four ram breeders, were frozen with different concentrations of myricetin (0, 1, 10, 100 and 1000nM). After thawing, the semen was evaluated for spermatic kinetics, plasma and acrosome membrane integrity, mitochondrial membrane potential, intracellular ROS levels, lipid peroxidation, and membrane stability. Samples treated with 10nM myricetin preserved a lower percentage of rapid cells ($P \leq 0.05$) when compared to the 1000nM myricetin group. Samples from the control group presented higher ($P \leq 0.05$) VAP than 10nM group of myricetin, while cryopreserved samples with myricetin (10, 100 and 1000nM) showed greater ($P < 0.05$) BCF, when compared to control group. The group treated with 1000nM myricetin had a higher percentage ($P < 0.05$) of cells with lipid peroxidation, when compared to the control group. In conclusion, supplementation of ram semen cryopreservation extender with 10 and 100nM myricetin affects sperm kinetics, without causing changes in the overall structure of the gamete, while 1000nM myricetin causes changes in the kinetics associated with peroxidative damage.

Keywords: sheep, antioxidants, flavonoids, cryopreservation

INTRODUÇÃO

A criopreservação do sêmen de carneiros é uma valiosa ferramenta para distribuição de material

genético. No entanto, o uso do sêmen congelado tem sido limitado devido às baixas taxas de gestação após a inseminação intracervical em ovinos (Salamon e Maxwell, 1995). Nos últimos tempos, tem-se buscado aperfeiçoar a técnica de criopreservação, na tentativa de melhorar o

Recebido em 15 de dezembro de 2016

Aceito em 24 de fevereiro de 2017

E-mail: luciacpa@hotmail.com

desempenho reprodutivo desses animais (Silva *et al.*, 2011), uma vez que os protocolos aplicados ainda afetam a estrutura e a resistência dos espermatozoides (Yeste, 2016).

O desequilíbrio entre as espécies reativas ao oxigênio (ROS) e os antioxidantes durante a congelamento, por exemplo, pode comprometer a fisiologia e a viabilidade das células espermáticas (Apriokur, 2013). A miricetina (3,5,7,3',4',5'-hexa-hidroxi-flavona) é um composto fenólico que apresenta diversos efeitos: antioxidante (Ong e Khoo, 1997) ou pró-oxidante (Chobot e Hadacek, 2011); efeito fitoestrogênico (Adeoya-Osiguwa *et al.*, 2003; Fraser *et al.*, 2006, Aquila *et al.*, 2013); e efeito inibidor da atividade de ATP-ase das bombas implicadas no transporte iônico (Thiyagarajah *et al.*, 1991).

Diversos estudos vêm sendo realizados para avaliar os efeitos antioxidantes de compostos fenólicos sobre os espermatozoides (Martinez-Soto *et al.*, 2010; Moretti *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2016). No entanto, não há relatos na literatura acerca da ação da miricetina em diluidores de congelamento de sêmen de qualquer espécie. Com isso, o presente estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* o efeito da suplementação do diluidor de congelamento do sêmen ovino com o flavonoide miricetina contra os danos ocasionados aos espermatozoides congelados-descongelados.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), com exceção dos fluorocromos CM-H₂DCFDA (5-(e-6)-carboxi-2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína), C11-BODIPY^{581/591} (4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-ácido undecanoico) e YO-PRO[®]-1 iodide, que foram adquiridos da Molecular Probes (Life Technologies, Eugene, EUA), e do fosfato salino tamponado (PBS), adquirido da Gibco[®] (Life Technologies, EUA). Soluções estoques dos fluorocromos foram preparadas da seguinte maneira: IP (25mg/mL), JC-1 (5mg/mL), CM-H₂DCFDA (0,5mM), C11-BODIPY^{581/591} (2mM), Merocianina 540 (M540: 54mM) e Yo-Pro-1 (1mM) em DMSO (dimetilsulfóxido) e FITC-conjugada ao *Peanut aglutinina* (FITC-PNA:1mg/mL) em PBS; as

soluções de trabalho: JC-1 (153µM) e C11-BODIPY^{581/591} (0,4mM) em DMSO e FITC-PNA (0,04mg/mL), IP (0,5mg/mL), CM-H₂DCFDA (50µM), M540 (270µM) e Yo-Pro-1 (2,5µM) em PBS. Todas as soluções foram armazenadas a -20°C. O diluidor de criopreservação do sêmen (Tris-gema de ovo - TGO) foi composto de 375mM de Tris, 124mM de ácido cítrico, 41,6mM de frutose, 20% de gema de ovo, 5% de glicerol, 100UI de penicilina e 50mg de estreptomicina, com pH 6,8. A solução estoque de miricetina (31,42mM) foi preparada em DMSO e armazenada a -20°C.

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (Ceua) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (licença 047/2015 Ceua-UFRPE). Foram utilizados quatro ovinos da raça Santa Inês, sexualmente maduros, com histórico de fertilidade, alojados no biotério do Hospital Veterinário da UFRPE, submetidos a manejo intensivo, alimentados com feno de capim Tifton e 400g/dia de ração comercial, além de água e sal mineral *ad libitum*. Os ejaculados foram obtidos usando-se vagina artificial, na presença de uma fêmea como manequim. As coletas de sêmen foram realizadas em dias alternados, totalizando oito coletas por animal (32 ejaculados). Imediatamente após a coleta, os ejaculados foram submetidos a avaliações macroscópicas e microscópicas de forma subjetiva, em microscópio de contraste de fase (Olympus, Japão; 100x). Em seguida, os ejaculados que apresentaram motilidade ≥70% foram aprovados e destinados à formação do *pool* (n=8).

Para congelamento, o *pool* de sêmen foi diluído em TGO suplementado de miricetina (0, 1, 10, 100 e 1000nM), na concentração final de 200 x 10⁶ espermatozoides/mL. Posteriormente, as amostras foram envasadas em palhetas (0,25mL) e congeladas em sistema automatizado (TK 3000[®] - TK Tecnologia em Congelamento Ltda., Brasil). A curva de refrigeração usada apresentava queda de temperatura de -0,25°C/min até atingir 5°C, temperatura na qual o material permaneceu por 120min (tempo de estabilização). Em seguida, foi iniciada a curva de congelamento, com queda de -20°C/min, até atingir -120°C, após o que as palhetas foram imersas e estocadas em nitrogênio líquido (-196°C).

No momento das análises, quatro palhetas de cada grupo experimental foram descongeladas em banho-maria (37°C/30s), agrupadas e destinadas às avaliações de cinética espermática, integridade de membranas plasmática e acrossomal (iMPA), potencial de membrana mitocondrial (PMM), níveis de ROS intracelular (iROS), peroxidação lipídica (LPO) e estabilidade de membrana (eMP).

Para o estudo da cinética espermática, uma alíquota (10µL) de sêmen foi diluída em TGO sem glicerol para concentração de 50 x 10⁶ espermatozoides/mL e incubada em banho-maria (37°C/15min). A seguir, 2,5µL da amostra diluída foram depositados em lâmina, coberta com lamínula (18 x 18mm), previamente aquecidas (37°C), e avaliados em microscópio de contraste de fase (Eclipse 50i; Nikon, Japão; 100x). As imagens foram capturadas com uma câmera digital Basler A312FC (Basler Vision Technologies, Alemanha). Pelo menos cinco campos aleatórios foram escolhidos, com registro de, no mínimo, 500 espermatozoides. Os parâmetros cinéticos avaliados utilizando o *software* SCA™, versão 5.1 (Microptics, S.L., Barcelona, Espanha), foram: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), rápidos (RAP, %), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %) e índice de oscilação (WOB, %); velocidade curvilínea (VCL, µm/s), velocidade em linha reta (VSL, µm/s) e velocidade média da trajetória (VAP, µm/s); deslocamento lateral da cabeça (ALH, µm) e frequência de batimento cruzado (BCF; Hz).

Para citometria de fluxo, alíquotas (50µL) de sêmen de cada grupo experimental foram distribuídas em microtubos (1,5mL), para cada uma das avaliações, aos quais foi adicionado 1,0mL de PBS, lentamente, através da parede do tubo, e homogeneizadas. Em seguida, realizou-se a centrifugação (500g/5min) para retirada de diluidor; após, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensão em 40µL de PBS.

Para avaliação da iMPA, adicionaram-se à amostra 5µL da solução de trabalho de FITC-PNA e 5µL de IP. A amostra foi incubada por 5min em temperatura ambiente e, em seguida, procedeu-se à leitura. Células que apresentam marcação PNA-/IP- foram classificadas como portadoras de membranas acrossomal e plasmática intactas; células com marcação

PNA+/IP-, membrana acrossomal reagida e plasmática intacta; células com marcação PNA-/IP+, membrana acrossomal intacta e plasmática lesionada; e células com marcação PNA+/IP+, membranas acrossomal e plasmática lesionadas.

Para análise do PMM, adicionaram-se 5µL da solução de trabalho de JC-1 à amostra de sêmen. A seguir, as amostras foram incubadas por 5min em temperatura ambiente e procedeu-se à leitura. Células com peça intermediária coradas em laranja foram classificadas com alto potencial de membrana mitocondrial e células com peça intermediária coradas em verde, com baixo potencial de membrana mitocondrial.

Os níveis de iROS foram avaliados por meio da marcação com o fluorocromo CM-H₂DCFDA, sendo adicionados às amostras 5µL da solução de trabalho, as quais foram incubadas em banho-maria (37°C/30min). Em seguida, as amostras foram centrifugadas (200g/5min), o sobrenadante foi eliminado e o *pellet* ressuspensão com 40µL de PBS. A seguir, adicionaram-se 5µL da solução de trabalho de IP, as amostras foram incubadas por mais 5min em temperatura ambiente e realizou-se a leitura. Os resultados foram expressos como percentual de células viáveis com altos níveis de ROS (DCFDA+), aquelas marcadas em verde fluorescente, ou células viáveis com baixa produção de ROS (DCFDA-), aquelas não marcadas ou com baixa intensidade de fluorescência.

O fluorocromo C11-BODIPY^{581/591} foi utilizado para avaliar a LPO nos espermatozoides, sendo adicionados à amostra 5µL de sua solução de trabalho, a qual foi incubada em banho-maria (37°C/30min). Em seguida, foi adicionado 1,0mL de PBS lentamente pela parede do tubo, a amostra foi homogeneizada e procedeu-se à centrifugação (200g/5min), para se eliminarem os restos de fluorocromos não ligados. O sobrenadante foi eliminado e o *pellet* ressuspensão com 40µL de PBS. Em seguida, as amostras foram avaliadas: células coradas em laranja (C11-BODIPY-), não peroxidadas, e coradas em verde (C11-BODIPY+), peroxidadas.

A associação dos fluorocromos M540 e Yo-Pro-1 foi utilizada para avaliar a eMP dos espermatozoides. Para tanto, 5µL do Yo-Pro-1 foram adicionados na amostra e incubados em banho-maria (37°C/15min). A seguir, foram adicionados 5µL de M540, à amostra, que foi

incubada por 5min em temperatura ambiente, e, logo após, procedeu-se à leitura, quando foram identificadas quatro populações: células viáveis com membrana estável (M540-/Yo-Pro-1-); células viáveis com membrana desestabilizada (M540+/Yo-Pro-1-); células não viáveis com membrana estável (M540-/Yo-Pro-1+) e células não viáveis com membrana desestabilizada (M540+/Yo-Pro-1+). Os resultados foram expressos como percentual de células viáveis com membranas estáveis (M540-) ou desestabilizadas (M540+).

As avaliações do sêmen foram realizadas utilizando-se aparelho ImageStream[®]X, versão Mark II (Amnis, Seattle, WA, EUA). As aquisições dos dados foram realizadas usando-se o *software* INSPIRE[®], versão 200.1.388.0 (Amnis, Seattle, WA, EUA). Os espermatozoides em foco foram separados mediante histograma do gradiente RMS x frequência normalizada, e as células únicas foram identificadas por meio de um gráfico de pontos da área x relação de aspecto, que foi verificado pelas imagens da galeria do canal campo claro. Todos os fluorocromos foram excitados por um *laser* de 488nm. Para a associação FITC-PNA+IP, a potência do *laser* utilizada foi de 55mW, o FITC-PNA foi detectado no canal 2 (505-560nm), e o IP no canal 5 (640-745nm); para o JC-1, a potência do *laser* foi de 130mW, e a detecção nos canais 2 e 4 (595-640nm); para o DCFDA+ IP, a potência do *laser* foi de 80mW, e os canais 2 e 5, respectivamente; no C11-BODIPY, a potência do *laser* foi de 60mW, e os canais 2 e 4; para a associação M540+ Yo-Pro-1, a potência do *laser* foi de 100mW, e a detecção nos canais 3 (560-595nm) e 2, respectivamente. Em cada uma das amostras, foram adquiridos 5000 eventos. O *software* IDEAS, versão 6.0 (Amnis, Seattle, WA, EUA), foi utilizado para análise dos dados. Todas as amostras foram analisadas e as populações divididas por meio de gráficos de pontos e histogramas, além da confirmação visual mediante as imagens das células.

Os dados obtidos foram analisados usando-se o procedimento Glimmix do SAS (Sistema para Windows, Versão 9.3; SAS Instituto Inc., Cary, NC, EUA), com metodologia de modelos lineares generalizados. Para MT, MP, RAP, LIN, STR, WOB, iMPA, PMM, iROS, LPO e eMP, utilizou-se uma distribuição binomial empregando-se a função logit link, e para VCL, VSL, VAP, ALH e BCF, a distribuição Gaussiana, utilizando-se a

função link de identificação. As variáveis foram analisadas por meio de um modelo matemático que incluiu os efeitos fixos do tratamento. O método residual foi usado para calcular os graus denominadores de liberdade para aproximar os testes F nos modelos mistos. As comparações ortogonais foram utilizadas para determinar o efeito da miricetina (controle vs. miricetina). Todas as comparações estatísticas foram realizadas usando-se médias ajustadas pelo método dos quadrados mínimos, e os resultados descritos foram apresentados como quadrados mínimos \pm erro-padrão da média (SEM), com as distribuições apresentadas nas escalas originais para auxiliar na interpretação. Diferenças com $P \leq 0,05$ foram consideradas significativas, e aquelas com $0,05 < P \leq 0,10$ foram consideradas tendências.

RESULTADOS

Na análise de cinética espermática, observou-se que MT, MP, VCL, VSL, LIN, STR, WOB e ALH não evidenciaram diferenças (Tab. 1; $P > 0,05$) ao se adicionar miricetina (1, 10, 100 e 1000nM) ao diluidor de congelação de sêmen ovino, em relação ao grupo controle. Além disso, a miricetina 10nM reduziu o percentual de gametas rápidos (Tab. 1; $P \leq 0,05$), quando comparada à miricetina 1000nM. Foi observada também tendência do grupo controle ser superior ao miricetina 10nM para RAP e inferior para STR ($P = 0,07$ e $P = 0,08$, respectivamente). No entanto, a adição de miricetina 10nM reduziu a VAP, em relação ao grupo controle (Tab. 1; $P \leq 0,05$), com tendência a ser inferior aos grupos 100 e 1000nM ($P = 0,08$ e $P = 0,052$, respectivamente), enquanto a adição de miricetina nas concentrações de 10, 100 e 1000nM aumentou o BCF (Tab. 1; $P \leq 0,05$).

Da mesma forma, a adição de miricetina (1, 10, 100 e 1000nM) não demonstrou incremento no percentual de células com membranas plasmática e acrossomal intactas, nem provocou alterações no potencial de membrana mitocondrial e na estabilidade das membranas quando esse grupo foi comparado ao grupo controle (Tab. 2; $P > 0,05$).

Para a produção de ROS intracelular identificada pelo CM-H₂DCFDA, não foram detectadas diferenças entre os grupos (Tab. 2; $P > 0,05$). No entanto, foi observado aumento no percentual de células peroxidadas (Tab. 2; $P \leq 0,05$) no grupo tratado com miricetina 1000nM, quando comparado ao grupo controle, não diferindo dos demais grupos.

Avaliação in vitro do sêmen...

Tabela 1. Parâmetros cinéticos (CASA) de espermatozoides criopreservados de ovino com meio de congelamento suplementado ou não com miricetina. Dados são expressos como média dos quadrados mínimos e erro-padrão

	Controle	1nM	10nM	100nM	1000nM
MT (%)	49.2±3.5	47.1±3.5	50.8±3.5	46.6±3.5	52.5±3.5
MP (%)	25.1±2.8	22.8±2.7	27.2±2.8	25.3±2.8	27.8±2.9
RAP (%)	18.3±2.7 ^{abx}	15.0±2.5 ^{ab}	11.5±2.4 ^{by}	16.8±2.6 ^{ab}	20.8±2.8 ^a
VCL (µm/s)	92.8±3.4	87.3±3.4	84.9±3.4	88.0±3.4	89.5±3.4
VSL (µm/s)	51.6±2.2	48.7±2.2	47.2±2.4	52.4±2.2	52.5±2.2
VAP (µm/s)	66.1 ± 2.4 ^a	61.3±2.4 ^{ab}	57.8±2.6 ^{by}	64.1±2.4 ^{abx}	65.0±2.4 ^{abx}
LIN (%)	56.0±1.9	56.0±1.9	58.7±1.8	59.6±1.8	58.7±1.8
STR (%)	78.5±1.5 ^y	79.3±1.5	82.2±1.4 ^x	81.8±1.4	80.6±1.5
WOB (%)	71.5±1.2	70.2±1.2	71.5±1.2	73.0±1.2	72.7±1.2
ALH (µm)	2.7±0.0	2.7±0.0	2.6±0.0	2.6±0.0	2.7±0.0
BCF (Hz)	13.1±0.1 ^b	13.3±0.1 ^{ab}	13.7±0.1 ^a	13.7±0.2 ^a	13.8±0.2 ^a

^{a,b} Quando presentes, na mesma linha, indicam diferença significativa (P<0,05) entre os grupos.

^{x,y} Quando presentes, na mesma linha, indicam tendência (0,05< P≤0,10) entre os grupos.

Tabela 2. Avaliação por citometria de fluxo da integridade de membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, níveis de ROS intracelular, peroxidação lipídica e estabilidade de membrana de espermatozoides de carneiros após congelamento em meio suplementado ou não com miricetina. Dados expressos como média dos quadrados mínimos e erro-padrão

	Controle	1nM	10nM	100nM	1000nM
PNA-/IP-	26.3±1.3	26.6±1.3	25.6±1.3	25.6±1.3	25.3±1.3
PNA-	68.3±2.1	69.7±2.0	70.7±2.0	67.2±2.1	68.8±2.1
APMM	8.7±1.3	11.5±1.5	10.3±1.4	8.5±1.3	10.0±1.4
DCFDA+	41.1±5.5	39.7±5.5	44.8±5.6	45.7±6.0	44.7±5.6
C11-BODIPY -	93.8±1.9 ^a	91.1±2.0 ^{ab}	89.3±2.2 ^{ab}	89.5±2.0 ^{ab}	87.2±2.2 ^b
M540-/ Yo-Pro-1-	5.7±2.0	8.2±2.3	10.3±2.5	9.6±2.4	9.6±2.4
M540+/ Yo-Pro-1-	93.8±2.1	91.6±2.2	91.8±2.4	89.6±2.5	90.1±2.4

Letras minúsculas diferentes, quando presentes, na mesma linha, indicam diferença significativa (P<0,05) entre os grupos.

DISCUSSÃO

O presente estudo amplia o conhecimento sobre os efeitos da suplementação do diluidor de congelamento de sêmen ovino com o flavonoide miricetina. Os resultados obtidos demonstram que a adição de miricetina na concentração de 10nM provocou redução do percentual de espermatozoides rápidos, quando esse grupo foi comparado ao grupo 1000nM, aliado à tendência de ser inferior ao controle. Além disso, os valores de VAP foram inferiores quando esse grupo foi comparado ao controle, mostrando ainda tendência a ser inferior quando comparado aos grupos 100 e 1000nM, enquanto as concentrações de 10, 100 e 1000nM aumentaram o BCF. Não foram observadas quaisquer alterações no grupo 1nM.

Com o advento de sistemas computadorizados para análise do sêmen, além da avaliação objetiva e precisa da motilidade, diversas variáveis cinéticas puderam ser mensuradas e seu valor prognóstico sobre a fertilidade tem sido estudado (Gillan *et al.*, 2008). Parâmetros cinéticos como VAP, VCL e BCF têm sido demonstrados como possuindo alta correlação com a fertilidade do sêmen congelado-descongelado de ovinos (Del Olmo *et al.*, 2013).

Embora o BCF possua alta correlação com a fertilidade, quando associado à redução dos valores de VAP e %RAP, como observado no presente estudo, pode-se sugerir o desenvolvimento de um padrão cinético de espermatozoides hiperativados, evento caracterizado por movimentos vigorosos e de baixa progressão, que só deve ocorrer no oviduto próximo ao momento da ovulação (Suarez, 2008).

Portanto, apesar de haver fortes evidências de que a hiperativação seja requerida para penetração na zona pelúcida (Suarez, 2008), a adição de 10nM de miricetina ao meio de congelamento de sêmen ovino pode não ser interessante, já que a hiperativação precoce no sêmen criopreservado está relacionada a baixas taxas de fertilidade *in vivo* (Yániz et al., 2015).

Por outro lado, na concentração de 100nM, houve apenas o aumento no BCF, sem alterações nos demais parâmetros cinéticos, nem na estrutura geral dos espermatozoides, o que pode ser favorável à fertilização, uma vez que a migração e a penetração do espermatozoide no muco cervical são favorecidas por elevados valores de BCF e LIN (Mortimer, 2000).

Os fitoestrógenos são compostos vegetais de ocorrência natural, que são estrutural e/ou funcionalmente semelhantes aos estrógenos de mamíferos e aos seus metabólitos ativos, os quais podem interagir com os receptores de estógeno (REs) para promover e/ou inibir respostas estrogênicas (Patisaul e Jefferson, 2010). Estudos prévios demonstraram a presença de REs em espermatozoides de carneiros, distribuídos em distintos imunotipos de acordo com a localização celular (Casao et al., 2011). Além disso, a incubação de espermatozoides ovinos com estradiol não afetou a motilidade progressiva ou a integridade da membrana plasmática, entretanto resultou em aumento no percentual de espermatozoides capacitados (Gimeno et al., 2016).

Como a miricetina foi relatada por atuar como um agonista para REs em espermatozoides humanos e provocar alterações fisiológicas associadas à capacitação espermática (Aquila et al., 2013), os resultados relatados no presente estudo poderiam ser explicados pelo pressuposto de que a miricetina exerceu seus efeitos no sêmen ovino por meio de um mecanismo envolvendo a sinalização dos REs. Mudanças na cinética espermática também poderiam estar relacionadas à propriedade inibidora da miricetina sobre a atividade ATP-ase das bombas relacionadas ao transporte de íons, tais como o íon Ca^{2+} (Thiyagarajah et al., 1991). No entanto, esses mecanismos não foram testados neste experimento, o que evidencia a necessidade de serem abordados em estudos futuros.

O uso da miricetina na maior concentração demonstrou ter efeitos adversos sobre os espermatozoides ovinos pós-descongelamento. Os resultados deste experimento, mostraram que a suplementação do diluidor com 1000nM de miricetina provocou aumento no percentual de espermatozoides peroxidados, enquanto as menores concentrações (1, 10 ou 100mM) não afetaram a peroxidação lipídica. A miricetina tem sido relatada como sendo um potente antioxidante ou pró-oxidante, dependendo das condições (Chobot e Hadacek, 2011). É digno de nota que a atividade antioxidante ou a pró-oxidante de flavonoides dependem de sua estrutura, da concentração e da fonte de radicais livres (Barreiros et al., 2006).

Devido à escassez de estudos anteriores relacionados com as ações da miricetina sobre a função espermática *in vitro*, os resultados do efeito da miricetina não são intensamente discutidos.

CONCLUSÃO

Em conclusão, a suplementação do diluidor de criopreservação de sêmen ovino com 10 e 100nM de miricetina afeta a cinética espermática sem provocar alterações na estrutura geral do gameta, enquanto 1000nM de miricetina acarretam mudanças na cinética associadas a danos peroxidativos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Facepe, à Capes e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- ADEOYA-OSIGUWA, S.A.; MARKOULAKI, S.; POCOCK, V. et al. 17beta-Estradiol and environmental estrogens significantly affect mammalian sperm function. *Hum. Reprod.*, v.18, p.100-107, 2003.
- APRIOKUR, J.S. Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. *J. Reprod. Infertil.*, v.14, p.158-172, 2013.
- AQUILA, S.; SANTORO, M.; AMICIS, F. et al. Red wine consumption may affect sperm biology: the effects of different concentrations of the phytoestrogen myricetin on human male gamete function. *Mol. Reprod. Dev.*, v.80, p.155-165, 2013.

- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quím. Nova*, v.29, p.113-123, 2006.
- CASAO, A.; GALLEGO, M.; PEREZ-PE, R.; MUINO-BLANCO, T.; CEBRIAN-PEREZ, J. Immunolocalization of estrogen receptor beta in ejaculated ram spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.*, v.46, Suppl.3, p.93, 2011.
- CHOBOT, V.; HADACEK, F. Exploration of pro-oxidant and antioxidant activities of the flavonoid myricetin. *Redox. Rep.*, v.16, p.242-247, 2011.
- DEL OLMO, E.; BISBAL, A.; MAROTO-MORALES, A. *et al.* Fertility of cryopreserved ovine semen is determined by sperm velocity. *Anim. Reprod. Sci.*, v.138, p.102-109, 2013.
- FRASER, L.R.; BEYRET, E.; MILLIGAN, S.R.; ADEOYA-OSIGUWA, S.A. Effects of estrogenic xenobiotics on human and mouse spermatozoa. *Hum. Reprod.*, v.21, p.1184-1193, 2006.
- GILLAN, L.; KROETSCH, T.; MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. Assessment of *in vitro* sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Anim. Reprod. Sci.*, v.103, p.201-214, 2008.
- GIMENO, S.; DEL MOLINO, L.; CASAO, A. *et al.* Effect of 17-estradiol and progesterone on ram sperm functionality. *Anim. Reprod. Sci.*, v.169, p.111, 2016.
- MARTINEZ-SOTO, J.C.; DIOSHOURCADE, J.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Effect of genistein supplementation of thawing medium on characteristics of frozen human spermatozoa. *Asian. J. Androl.*, v.12, p.431-441, 2010.
- MORETTI, E.; MAZZI, L.; TERZUOLI, G. *et al.* Effect of quercetin, rutin, naringenin and epicatechin on lipid peroxidation induced in human sperm. *Reprod. Toxicol.*, v.34, p.651-657, 2012.
- MORTIMER, S.T. CASA—practical aspects. *J. Androl.*, v.21, p.515-524, 2000.
- ONG, K.C.; KHOO, H.E. Biological Effects of Myricetin. *Gen. Pharmacol.*, v.29, p.121-126, 1997.
- PATISAUL, H.B.; JEFFERSON, W. The pros and cons of phytoestrogens. *Front. Neuroendocrinol.*, v.31, p.400-419, 2010.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, v.37, p.185-249, 1995.
- SILVA, E.C.B.; ARRUDA, L.C.P.; SILVA, S.V. *et al.* High resveratrol or quercetin concentrations reduce the oscillation index of frozen goat semen. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.68, p.1237-1243, 2016.
- SILVA, S.V.; SOARES, A.T.; BATISTA, A.M. *et al.* In vitro and in vivo evaluation of ram sperm frozen in tris egg yolk and supplemented with superoxide dismutase and reduced glutathione. *Reprod. Dom. Anim.*, v.46, p.874-881, 2011.
- SUAREZ, S.S. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int. J. Develop. Biol.*, v.52, p.455-462, 2008.
- THIYAGARAJAH, P.; KUTTAN, S.C.; LIM, S.C. *et al.* Effect of myricetin and other flavonoids on the liver plasma membrane Ca²⁺ pump. *Biochem. Pharmacol.*, v.41, p.669-675, 1991.
- YÁNIZ, J.L., PALACÍN, I., VICENTE-FIEL, S. *et al.* Sperm population structure in high and low field fertility rams. *Anim. Reprod. Sci.*, v.156, p.128-134, 2015. YESTE, M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*, v.85, p.47-64, 2016.