

UTILIZAÇÃO DA QUERCETINA NO CRIOPRESERVADOR DE SÊMEN EQUINO

STRAIOTO, Kleber Augusto¹
SILVA, Luan Sitó da²
FERRARI, Leonardo Henrique³
MARTINEZ, Antonio Campanha⁴
RIBEIRO, Max Gimenez⁵

RESUMO

No processo de congelação do sêmen equino é realizada a remoção do plasma seminal, expondo os espermatozoides a elevação nos níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e ocorrência de peroxidação lipídica, havendo maior dependência da adição de antioxidantes exógenos. Com o objetivo de aprimorar a qualidade espermática do sêmen criopreservado, através da prevenção ou redução do processo oxidativo, diversos pesquisadores têm se dedicado a realizar estudos relacionados à adição de antioxidantes nos diluidores seminais. O objetivo desse trabalho foi avaliar se a adição de quercetina ao criopreservador traz melhores índices de cinética espermática pós-descongelamento, e avaliar os índices de concepção após inseminação artificial, verificando se há diferença significativa nos resultados entre os grupos tratado em relação ao grupo controle. Com relação a cinética espermática a quercetina não trouxe efeitos benéficos em nenhum dos quesitos avaliados pós-descongelamento. Embora o número de animais gestantes tenha sido maior quando se utilizou sêmen oriundo dos grupos tratados, não houve diferença estatística.

PALAVRAS-CHAVE: criopreservação, reprodução equina, garanhão.

USE OF QUERCETINE IN THE EQUINO SEMEN CRYOPRESERVATOR

ABSTRACT

In the freezing process of equine semen, seminal plasma is removed, exposing sperm to elevated levels of Reactive Oxygen Species (EROs) and occurrence of lipid peroxidation, with greater dependence on the addition of exogenous antioxidants. In order to improve the sperm quality of cryopreserved semen, through the prevention or reduction of the oxidative process, several researchers have dedicated themselves to carrying out studies related to the addition of antioxidants in the seminal extenders. The objective of this work was to evaluate whether the addition of quercetin to the cryopreserver brings better rates of sperm kinetics after thawing, and to evaluate the conception rates after artificial insemination, checking if there is a significant difference in the results between the treated groups in relation to the control group. Regarding sperm kinetics, quercetin did not have any beneficial effects on any of the items evaluated after defrosting. Although the number of pregnant animals was higher when semen from the treated groups was used, there was no statistical difference.

KEYWORDS: cryopreservation, equine reproduction, stallion.

1. INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen oferece inúmeras vantagens para a reprodução equina, como: manter o sêmen estocado por período indeterminado; acelerar o melhoramento genético com a

¹ Médico veterinário, mestrandando do programa de pós-graduação em produção sustentável e saúde animal da Universidade Estadual de Maringá (UEM). E-mail: ksvet.ubirata@gmail.com

² Médico veterinário, mestrandando do programa de pós-graduação em produção sustentável e saúde animal da Universidade Estadual de Maringá (UEM). E-mail: luan-sito08@hotmail.com

³ Médico veterinário. E-mail: leonardoferriari.n@hotmail.com

⁴ Docente do curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Maringá (UEM). E-mail: antunico@gmail.com

⁵ Docente do curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Maringá (UEM). E-mail: mgrvet@bol.com.br

utilização de garanhões superiores, principalmente em locais de difícil acesso; preservar características raciais ou linhagens que no momento não sejam de interesse, funcionando como banco genético; contornar problemas com transporte de sêmen (custos elevados, transporte inadequado com variações na temperatura); evitar a transmissão de doenças entre propriedades, uma vez que se elimina a necessidade do transporte da égua e potro até o garanhão ou vice-versa (AMANN e PICKETT, 1987).

A espécie equina apresenta grande variabilidade individual na qualidade espermática, sendo um dos motivos para ocorrência deste fato, o critério de seleção do reprodutores, adotado pelos criadores e associações, os quais levam em consideração principalmente a genealogia e o desempenho atlético, deixando em segundo plano os parâmetros de fertilidade (UÇAN *et al*, 2016). Vidament (2005) constatou que 30% dos garanhões tinham sêmen com congelabilidade “boa”, 40% dos garanhões tiveram sêmen que congelou de “forma satisfatória” e 30% dos garanhões tiveram sêmen pós congelamento “insatisfatório”.

Muitos fatores podem interferir na qualidade e resistência do sêmen de garanhões ao processo da criopreservação, destacando-se principalmente os fatores genéticos relacionados à composição da membrana plasmática, fazendo com que esta esteja mais ou menos suscetível aos danos provocados pelo processo (Ramires Neto *et al*, 2016).

A necessidade de produzir novos diluentes, ou modificações nos diluentes existentes no mercado para promover melhores resultados é constante. Apesar do grande avanço na tecnologia do sêmen e a permissão de uso da inseminação artificial pela maioria das associações de raças, o procedimento ainda requer melhorias para alcançar padronização (HECKENBICHLER *et al*, 2011; GALLARDO BOLAÑOS *et al*, 2012).

O objetivo desse trabalho foi avaliar se a adição de quercetina ao criopreservador traz melhores índices de cinética espermática pós-descongelação, e avaliar os índices de concepção após inseminação artificial, verificando se há diferença significativa nos resultados entre os grupos tratado em relação ao grupo controle.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CRIOPRESERVAÇÃO

Embora apresente inúmeras vantagens, a criopreservação apresenta limitações em várias raças equinas (ALVARENGA *et al*, 2004). Isto porque a congelação/descongelação do sêmen ocasiona prejuízos, muitas vezes irreversíveis aos espermatozoides como perda de motilidade, alterações estruturais e funcionais da membrana espermática e, consequentemente, diminuição do poder fecundante (SANTOS *et al*, 2015).

Em geral, assume-se que 40-50% dos espermatozoides não sobrevivem ao processo de congelação e descongelação (WATSON, 2000). Vários fatores foram relacionados às alterações causadas pela congelação como: transição de fase na membrana, estresse oxidativo, apoptose e capacitação, estresse mecânico nas membranas devido ao estresse osmótico e mudanças de temperatura durante o processo de congelamento e descongelamento, que contribuem para a morte do espermatozoide, ou para a sua vida reduzida (ORTEGA-FERRUSOLA *et al*, 2009).

Somente o plasma seminal não é capaz de proteger adequadamente os espermatozoides contra mudanças de temperatura. Para o sêmen ser estocado em baixas temperaturas é necessário que os mesmos sejam acrescidos de diluidores especiais e apropriados (SOUZA *et al*, 2016). Diluidores crioprotetores são solventes orgânicos utilizados com a finalidade de proteger as células e/ou tecidos contra as injúrias causadas pela desidratação e resfriamento durante o processo de criopreservação, essas substâncias são importantes para evitar a formação de gelo intracelular, redução do estresse osmótico por meio da reposição de água necessária para manutenção do volume celular e a interação com íons e macromoléculas (LAYER *et al*, 2016).

Com o objetivo de aprimorar a qualidade espermática do sêmen criopreservado através da prevenção ou redução do processo oxidativo, 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).

2.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)

Os termos radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) são usados no meio científico para identificar os intermediários químicos reativos oriundos do metabolismo do oxigênio, entre eles:

o radical superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH^\bullet) e o peróxido de hidrogênio (H^2O^2) (MAIA e BICUDO, 2009).

Embora as EROs tenham funções fisiológicas em diferentes tipos de células, altas concentrações destas são prejudiciais às funções celulares, podendo danificar todos os tipos de biomoléculas, incluindo DNA, proteínas e lipídios (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Dentre todas as áreas sujeitas aos danos causados pelos radicais livres, a membrana celular é uma das mais vulneráveis, com a perda da sua integridade, ocorre o comprometimento de entrada e saída de fluidos e nutrientes da célula, afetando sua função (STEINER e ADDOR, 2014).

2.3 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio entre os fatores pró-oxidantes e antioxidantes, em favor dos primeiros. O sistema de defesa antioxidante tem o objetivo primordial de manter o processo oxidativo dentro dos limites fisiológicos e passíveis de regulação (BARBOSA *et al*, 2010).

2.4 SUBSTANCIAS ANTIOXIDANTES

Substâncias antioxidantes vêm sendo acrescidas aos meios diluentes com o intuito de minimizar os efeitos deletérios causados pelas EROs aos espermatozoides de várias espécies. Antioxidantes retardam a velocidade de oxidação através da manutenção da produção de EROs em níveis fisiológicos (PUGLIESI *et al*, 2012).

2.5 QUERCETINA

A quercetina é um flavonóide que apresenta funções antioxidantes, anti-inflamatórias e anti-carcinogênicas. É possível encontrar tal composto em alimentos como cebola roxa, alcaparras, pimentão amarelo, limão, maçã com casca, uva vermelha, brócolis, cervejas em lata, entre outros, apresentando uma quantidade variável em cada alimento (RESENDE, 2009).

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).

No sêmen equino, a quercetina reduz a peroxidação lipídica dos espermatozoides durante o congelamento e evita sua capacitação prematura antes da inseminação artificial (MCNIVEN e RICHARDSON, 2006).

3. METODOLOGIA

Foram realizadas seis coletas de sêmen de um mesmo garanhão da raça Quarto de Milha de 13 anos de idade, localizado no município de Umuarama, estado do Paraná – Brasil.

As coletas foram realizadas utilizando vagina artificial (modelo Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil), e o ejaculado filtrado para retirada da fração gelatinosa.

Cada ejaculado foi dividido em três grupos:

G1: Grupo controle: o sêmen foi congelado apenas com o criopreservador convencional (Botucrio ®).

G2: Grupo Q10: junto ao criopreservador, foi adicionado 10 μ g de quercetina/mL do criopreservador convencional (Botucrio ®).

G3: Grupo Q20: junto ao criopreservador, foi adicionado 20 μ g de quercetina/mL do criopreservador convencional (Botucrio ®).

3.1 PROCESSAMENTO DO EJACULADO

A concentração espermática foi determinada através de contagem de células na câmara de Neubauer, na proporção de 10 μ L sêmen para 190 μ L de água destilada.

O ejaculado foi diluído em meio diluente à base de leite (Botu-Sêmen ® Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) na proporção de 1:1, centrifugado a 600xG durante 10 minutos, o sobrenadante desprezado e o “pellet” ressuspêndido em diluente de congelação (Botu-Crio ® , Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil) adicionado ou não de quercetina, de acordo com o grupo testado.

Em cada coleta foram congeladas seis amostras (palhetas de 0,25mL contendo 20 milhões de espermatozoides) por grupo, posteriormente essas amostras foram avaliadas nos parâmetros de cinética espermática por meio do sistema computadorizado CASA - Computer Assisted Sperm

Analysis (Androvision MINITUBE) mensurando três campos aleatórios. Para cada amostra foi avaliada motilidade espermática total (MT [%]), motilidade espermática progressiva (MP [%]), percentual de espermatozoides com movimento rápido (RAP [%]), percentual de espermatozoides com movimento lento (LEN [%]), percentual de espermatozoides imóveis (IMO [%]), distância percorrida real (DCL [μm]), distância percorrida em linha reta (DSL [μm]), distância percorrida do traçado médio (DAP [μm]), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF [Hz]), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH [μm]).

Também foram congeladas amostras dos três grupos para realizar inseminação artificial e avaliar a taxa de concepção de acordo com o grupo utilizado. As amostras utilizadas para inseminação artificial foram confeccionadas em palhetas de 0,5mL contendo 100 milhões de espermatozóides cada.

3.2 REFRIGERAÇÃO E CONGELAÇÃO DAS AMOSTRAS

Após envasadas, as amostras foram submetidas à refrigeração a 5°C durante 20 minutos, através do processo de refrigeração passiva em recipiente para transporte de sêmen (modelo Botu-Flex ®, Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil), em seguida foram colocadas a seis centímetros acima do nível do nitrogênio líquido mantido em caixa de isopor, recebendo o vapor por 20 minutos, e subsequentemente submergidas no nitrogênio líquido e armazenadas em botijão até a utilização para Inseminação Artificial, ou análise de cinética espermática.

3.3 INSEMINAÇÕES COM AS AMOSTRAS

Com a finalidade de verificar a eficácia *in vivo*, dezoito éguas foram inseminadas, sendo seis éguas em cada grupo experimental. Utilizou-se éguas adultas, sadias que tiveram a ovulação induzida com hormônio a base de histrelina 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Strelin ®) quando apresentavam folículos únicos, com diâmetro acima de 35mm, e edema uterino entre grau 2 ou 3 em uma escala de 0-3, parâmetros sugeridos por Ley (2006).

O acompanhamento folicular foi realizado a partir das 24 horas pós indução da ovulação, com o intuito de avaliar a morfologia do folículo, e apartir das 34 horas após indução foi realizado acompanhamento da ovulação, sendo que a partir desse período o acompanhamento foi realizado com

intervalos de duas horas, para se obter uma inseminação mais próxima possível do momento da ovulação, como preconizado por Hunter (1990).

As inseminações foram realizadas no corno uterino ipsilateral ao ovário em que houve a ovulação com uma palheta por égua, logo após o momento da ovulação. O diagnóstico de gestação foi realizado via transretal, com aparelho de ultrassom na freqüência de 7,5 MHz aos 15 dias após a inseminação artificial.

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados com auxílio do programa SAS (Versão 9.0). As variáveis foram analisadas pelo PROC MIXED, utilizando um modelo linear misto para as medidas repetidas no tempo. As variáveis que apresentaram efeito significativo foram submetidas ao PROC LSMEANS, com o teste de Tukey ajustado. Para análise da taxa de concepção utilizou-se o Teste de Qui-Quadrado.

4. RESULTADOS

Os resultados da cinética espermática estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Médias \pm desvio padrão da cinética espermática dos grupos Controle e das duas concentrações de Quercetina (10 μ g/ml e 20 μ g/ml).

	Controle	10Q	20Q
MT (%)	38,70 \pm 1,51	36,60 \pm 1,68	36,04 \pm 1,55
MP (%)	32,09 \pm 1,52	30,28 \pm 1,69	30,24 \pm 1,56
RAP (%)	9,51 \pm 0,48	7,83 \pm 0,54	7,90 \pm 0,49
LEN (%)	22,43 \pm 1,23	22,47 \pm 1,38	22,37 \pm 1,27
IMO (%)	61,30 \pm 1,51	63,40 \pm 1,68	63,96 \pm 1,55
DCL (μ m)	19,51 \pm 20,46	16,45 \pm 18,45	18,03 \pm 19,03
DSL (μ m)	8,24 \pm 10,41 ^a	6,26 \pm 8,84 ^c	7,00 \pm 9,19 ^b
DAP (μ m)	9,80 \pm 11,01	7,76 \pm 9,43	8,60 \pm 9,72
BCF (Hz)	7,93 \pm 10,31 ^a	6,13 \pm 8,99 ^c	6,77 \pm 9,05 ^b
ALH (μ m)	0,51 \pm 0,42	0,47 \pm 0,41	0,51 \pm 0,43

*Valores com letras diferentes, na mesma linha, diferem significamente ($p < 0,05$).

MT: motilidade espermática total; MP: motilidade espermática progressiva; RAP: espermatozóides com movimento rápido, LEN: espermatozóides com movimento lento; IMO: espermatozóides imóveis; DCL: distância percorrida real; DSL: distância percorrida em linha reta; DAP: distância percorrida do traçado médio; BCF: frequência de batimento flagelar cruzado; ALH: amplitude de deslocamento lateral da cabeça.

Os resultados obtidos com as inseminações estão apresentados na Tabela 2. Não foi observada diferença significativa nos índices de concepção com a adição da quercetina.

Tabela 2 – Resultados de concepção após inseminação artificial (I.A) das éguas.

	I.A (n)	Gestantes	Não gestantes	Índice de concepção
Controle	6	3	3	50%
10Q	6	4	2	66,66%
20Q	6	4	2	66,66%
Total	18	11	7	61,11%

Fonte: Dados da pesquisa.

5. DISCUSSÃO

Diante da variabilidade de concentrações de quercetina utilizadas frequentemente nas diferentes espécies referenciadas na literatura, o presente estudo avaliou o efeito da adição de 10 μ g e 20 μ g de quercetina/mL de criopreservador, buscando avaliar o possível incremento nos índices de cinética espermática pós-descongelação.

Estudos tem demonstrado a eficácia do emprego de antioxidantes ao sêmen, assim como seus efeitos deletério. A justificativa parece estar relacionada a dose adicionada ao meio diluidor, que em excesso é prejudicial e pode comprometer a amostra (SAVI *et al*, 2015).

O tratamento com quercetina nas duas concentrações utilizadas nas amostras não trouxe efeitos benéficos em nenhum dos quesitos avaliados no CASA.

Silva *et al* (2012) realizaram um estudo com sêmen congelado de ovinos adicionando quercetina, no qual também não encontraram benefícios na cinética espermática utilizando a concentração de 20 μ g/mL de quercetina ao diluente, sugerindo que o antioxidante, nestas concentrações, não tenha influência significativa sobre a cinética espermática na avaliação imediatamente após descongelação.

Porém Silva *et al* (2016) relataram que a adição de 20 μ g de quercetina/mL ao diluente de congelação equino resultou em redução significativa nos níveis de EROs e peroxidação lipídica após descongelação, minimizando o estresse oxidativo sofrido pelas células.

Tironi *et al* (2019) relataram que o tratamento com quercetina foi capaz de melhorar velocidades (VCL, VSL, VAP) e, como consequência, a linearidade no esperma de touro na concentração de 20 μ g/mL, concluindo que a adição de quercetina no diluente foi capaz de promover efeitos benéficos para o sêmen bovino.

A avaliação da taxa de concepção foi estatisticamente semelhante entre os grupos avaliados (Tabela 2), sendo superior aos índices encontrados na literatura.

Samper *et al*, (2001) relataram que a fertilidade por ciclo realizando inseminação com sêmen congelado pode variar entre 30 a 40%, índice semelhante ao relatado por Hoffmann *et al*, (2011) que descrevem índices oscilando entre 25 e 40% quando se trabalha com sêmen congelado equino.

É sabido que as inseminações artificiais utilizando sêmen congelado ainda resultam em menores taxas de fertilidade, quando comparadas aos resultados com sêmen a fresco ou resfriado (ALVARENGA *et al*, 2016).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A quercetina não trouxe efeitos benéficos na cinética espermática do sêmen equino e nem diferença estatística na taxa de concepção após inseminação artificial.

REFERÊNCIAS

ALVARENGA M.A., LEÃO K.M., PAPA F.O., LANDIM-ALVARENGA F.C., MEDEIROS A.S. L. & GOMES G.M. The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. **Havemeyer Foundation Monograph Series** v. 12, p. 74-76. 2004.

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; RAMIRES NETO, C. Advances in stallion semen cryopreservation. **Vet. Clin. Equine**, v.32, p.521- 530, 2016.

AMANN, R.P., PICKETT, B.W. Principle of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion sperma-tozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, p. 145 -173, 1987.

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. **Rev. Nutr., Campinas**, v. 23, n. 4, p. 629-643, jul/ago, 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.

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 frozen-thawed ram semen. **Theriogenology**, v. 76, p. 342-350, 2011.

GALLARDO BOLAÑOS, J. M. et al. Autophagy and apoptosis have a role in the survival or death of stallion spermatozoa during conservation in refrigeration. **PloS one**, v. 7, n. 1, p. e30688, 2012.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Free radicals in biology and medicine. 3.ed. New York: **Oxford University Press**, 1999.

HECKENBICHLER, S.; DEICHSEL K.; AURICH C. Quality and fertility of cooled-shipped stallion semen at the time of insemination. **Theriogenology**, v. 75, n. 5, p. 849-856, 2011.

HOFFMANN, H.; OLDENHOF, H.; MORANDINI, C.; ROHN, K.; SIEME, H. Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified ‘good’ or ‘poor’ for freezing. **Animal Reproduction Science**, v. 125, p.112-118, 2011.

HUNTER, R.H.F. Gamete lifespans in the mare’s genital tract. **Equine Veterinary Journal**, v. 22, p.378-379, 1990.

LAYEK SS, MOHANTY TK, KUMARESAN A, PARKS JE. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. **Anim Reprod Sci**. 2016.

LEY WB. Reprodução em éguas para veterinários de equinos. São Paulo: **Roca**, 215p., 2006.

MAIA MS, BICUDO SD. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, p.183-193, 2009.

MCNIVEN M, RICHARDSON G. Effect of quercetin on capacitation status and lipid peroxidation of stallion spermatozoa. **Cell Preservation Technology**. v. 4, p. 169-177, 2006.

ORTEGA-FERRUSOLA. C., GONZÁLEZ F. L., MORRELL J.M., SALAZAR S. C., MACÍAS G. B., RODRÍGUEZ-MARTINEZ H., TAPIA J.A., PEÑA F.J., Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion dependent and is related to apoptotic-like changes. **Reproduction**, v. 138, p. 55-63, 2009.

PUGLIESI G, DE CARVALHO GR, RATES DM, KER PG, DA MATTA MP, OLIVEIRA RR, FILHO JMS. Viability and fertility of cooled equine semen diluted with skimmed milk or glycine egg yolk-based extenders. **R Bras Zootec**. 2012.

RAMIRES NETO C, PAPA FO, ALVARENGA MA. Plasma membrane lipid profile from resistant and sensitive spermatozoa of Mangalarga Marchador stallions after cooling at 5°C. **J Equine Vet Sci**, v.43, p. S76-S77, 2016.

RESENDE, G. M. DE; COSTA, N. D. Produtividade e armazenamento de cebola (*Allium cepa L.*) submetida a doses de nitrogênio e potássio via fertirrigação em cultivo de verão. **Ciência e Agrotecnologia (UFLA)**, v. 33, n. 5, p. 153-163, 2009.

SAMPER J.C. “Management and fertility of mares bred with frozen semen” **Animal Reproduction Science**, p. 219-228, 2001.

SANTOS M. A. M. , GRADELA A. , MORAES E. A. , SOUZA W. L. , ALVES N. G., COSTA J. M. S. , MATOS W. C. G. Características do sêmen a fresco e descongelado de garanhões da raça Nordestina. **Pesq. Vet. Bras.** v. 35, n. 11, p. 925-932, 2015.

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 Veterinaria**, Jaboticabal, SP, v.31, n.1, 012-018, 2015.

SILVA E.C.B., GUERRA M.M.P., Terapias antioxidants na criopreservação espermática. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.107, p.143-149, 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 CONGELAÇÃO. **Dissertação (Dissertação em medicina veterinária)** UNESP. Botucatu-SP 2016.

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, 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.

SOUZA WL, MORAES EA, COSTA JMS, SOUSA PHF, LOPES JUNIOR ES, OLIVEIRA RP, TONIOLLI R. Efeito de diferentes concentrações de melatonina em espermatozoides de carneiros sobre estresse oxidativo após criopreservação. **Pesqui Vet Bras**. 2016.

STEINER, D.; ADDOR, F. Envelhecimento cutâneo. 1. ed. Rio de Janeiro: **AC Farmacêutica**, 2014. TIRONI S. M. T., MARTINEZ A. C., SEIXAS F. A. V., STEFANELLO T. F., NAKAMURA C. V., DE MORAES G. V. Effects of Treatment with Quercetin on the Quality of Cryopreserved Bovine Semen. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2019.

UÇAN U., KÜÇÜK N., AHMAD E., NASEER Z., AKSOY M., SERİN İ. & CEYLAN A. Effect of diffent sugars supplemented to the extender in combination with cholesterol-loaded cyclodextrin (CLC) on post-thaw quality of ram spermatozoa. **Small Ruminant Research**, v 136. p 243-246, 2016.

VIDAMENT, M. French field results (1985–2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1-4, p. 115-136, 2005.

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