

## ADIÇÃO DE VITAMINA E E SELÊNIO NO SÊMEN REFRIGERADO DE CÃES DA RAÇA BLUE HEELER

Ivo Walter dos SANTOS<sup>1</sup>; Marla SCHNEIDER<sup>2</sup>; Ingridy Müller WALTER<sup>3</sup>;

### RESUMO

A utilização de sêmen refrigerado é comum na prática reprodutiva devido ao fácil manuseio e baixo custo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a vitamina E e selênio como antioxidantes para conservação. No controle foi visualizada alterações causadas pelo tempo desde a segunda avaliação, nas amostras com vitamina E houve preservação da viabilidade espermática por mais tempo. O acréscimo de selênio não demonstrou diferença estatística na preservação espermática. Desta forma, concluiu-se que o uso de vitamina E mostrou ser eficiente na conservação do sêmen, enquanto a adição de selênio à vitamina E não demonstrou diferença estatística.

**PALAVRAS-CHAVE:** Vitamina E, Selênio, antioxidantes, motilidade, preservação.

**ABSTRACT:** The use of cooled semen is common in reproductive practice because of its easy handling and low cost. The objective of this work was to evaluate vitamin E and selenium as antioxidants for conservation. In the samples control was visualized changes caused by the time since the second evaluation, in the samples with vitamin E there was preservation of the sperm viability for longer. The addition of selenium did not show statistical difference in sperm preservation. Thus, it was concluded that the use of vitamin E showed to be efficient in the conservation of semen, while the addition of selenium to vitamin E did not show statistical difference.

**KEY-WORDS:** Vitamin E, Selenium, Antioxidants, Motility, Preservation

### INTRODUÇÃO

A técnica de inseminação artificial (IA) em cães pode ser utilizada como um meio alternativo à cobertura natural. Para sua realização deve-se coletar, analisar e preservar o sêmen. O interesse nas técnicas de preservação da célula espermática e de IA em cães vem crescendo em diversos países e novas tecnologias estão sendo usadas e estudadas por técnicos e pesquisadores em todo mundo (JOHNSTON e KUSTRITZ, 2001).

O uso de sêmen refrigerado seria, portanto, uma boa opção para a aplicação

clínica, já que possui menor custo, é um método prático, permitindo melhor preservação da fertilidade e realização da inseminação via transvaginal. A limitação para o seu uso é o curto tempo de sobrevivência dos espermatozoides armazenados (LINDE-FORSBERG, 1995). As maneiras existentes para prolongar essa sobrevivência seriam a utilização de meios diluentes adequados, que ofereçam energia, manutenção do pH e osmolaridade, proteção da integridade do acrossomo e membrana plasmática e diminuição do metabolismo dos espermatozoides através do armazenamento à temperatura de 4 a 5°C. Contudo, a fertilidade do sêmen refrigerado só é mantida por 12 a 24 horas (LINDE-FORSBERG, 1995).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) presentes no ejaculado são produzidas pelos espermatozoides e por leucócitos (CALAMERA et al, 2001; GRIVEAU e LANOU, 1997). Contudo, os espermatozoides submetidos à refrigeração e armazenamento se tornam envelhecidos e tendem a sofrer a peroxidação lipídica, perdendo assim, algumas características principais para a manutenção da sua capacidade fertilizante. As ROS podem causar, diretamente, a peroxidação lipídica, levando a queda na motilidade espermática e danos protéicos e de ácido nucléico levando a apoptose e a morte celular (AGARWAL et al, 2006; MOUSTAFA et al, 2004); ou indiretamente, causar estresse oxidativo devido à destruição dos antioxidantes citoplasmáticos. Apesar disso, pequenas quantidades de ROS são necessárias para a capacitação espermática (SALEH e AGARWAL, 2002) e processo de hiperativação (AGARWAL et al, 2006; AITKEN et al, 1994), sendo portanto, fundamentais durante a fertilização.

Sabe-se que os radicais livres como as espécies reativas ao oxigênio (ROS) são responsáveis por estresse celular e podem causar danos estruturais significantes às membranas e, principalmente, ao material genético dos espermatozoides. O uso de diluentes com antioxidantes, que promovem uma proteção aos espermatozoides, contra os danos do estresse oxidativo pode ser uma alternativa, para manter a qualidade do sêmen sob resfriamento ou congelamento (BARROS; TONIOLLI, 2011; MAIA; BICUDO 2009).

A vitamina E é o nome dado a um grupo de lipídios estreitamente relacionados, chamados tocoferóis, todos possuindo um anel aromático e uma longa cadeia

isoprenóide. Por serem hidrofóbicos, os tocoferóis associam-se membranas celulares, aos depósitos lipídicos, e às lipoproteínas sanguíneas. Os tocoferóis são antioxidantes biológicos, pois o anel aromático de sua molécula age destruindo a maior parte dos ROS e outros radicais livres, conferindo proteção aos ácidos graxos insaturados da oxidação e prevenindo o dano oxidativo das membranas lipídicas, que podem ocasionar em fragilidade celular (LEHNINGER; NELSON; COX et al., 2005; PENITENTE FILHO, 2010).

A vitamina E e B16 mostraram-se eficiente durante o HOST ( $P = 0,016$ ) diminuindo a produção de espécies reativas de oxigênio ( $P < 0,0005$ , Michael et al., 2009). No sêmen refrigerado, a adição de diluentes contendo antioxidantes provou ser benéfica. A adição de B16 (0,1 mM) ou vitamina E (0,1 mM) ao diluente TRIS- ácido cítrico-frutose, preservou a motilidade progressiva a viabilidade espermática significativamente melhor durante 72 h quando comparado com a adição de vitamina C (0,5 mM), ou nenhum antioxidante ( $P < 0,001$ ) (SCHÄFER-SOMI, 2015).

O selênio é um precursor da glutatona, a qual protege as células dos efeitos dos radicais livres, por meio da destruição de peróxidos de hidrogênio que lesam as células levando a morte celular. A deficiência de selênio reduz a atividade dessa enzima resultando em exposição das células as EROS, alterando assim suas estruturas de proteínas, lipídios e outras moléculas (NICOLODI, 2010). O selênio, micronutriente essencial, e precursor de enzimas antioxidantes que protegem o organismo contra a ação das espécies reativas de oxigênio, também é responsável pelas repostas imunológicas, locomoção dos espermatozoides e metabolismo de ácidos graxos (HADDAD & ALVES, 2006).

Com isso, sugere-se que a adição de moléculas antioxidantes no meio de diluição do sêmen refrigerado reduziria o impacto do estresse oxidativo durante o processo de armazenamento espermático e assim melhoraria a qualidade do sêmen, propiciando um maior tempo de sobrevivência dos espermatozoides e diminuição da dose inseminante do sêmen refrigerado (LINDE-FORSBERG, 1991).

O objetivo deste trabalho foi adicionar a vitamina E e selênio ao diluidor com o

intuíto de preservar a integridade do espermatozoide mantido a temperatura de 5°C prolongando sua fertilidade por até 72 horas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Animais e coleta de sêmen**

O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina no município de Palotina, PR, Brasil, durante os meses de julho de 2015 a junho de 2016. Foram utilizados sete cães da raça Blue Heeler com idade média de dois anos, mantidos na casa de seus proprietários. As coletas de sêmen foram realizadas Através de manipulação digital uma vez por semana. Após a adaptação e condicionamento dos animais, iniciou-se as coletas para o experimento, perfazendo três coletas por animal, totalizando 21 ejaculados. Após coleta da segunda fração, cada ejaculado foi avaliado quanto ao volume (medido em tubo graduado), concentração (câmara de Neubauer), motilidade progressiva e vigor Microscópio contraste de fase (CF), de acordo com HENRY & NEVES (1998). Foram utilizados apenas ejaculados em que a segunda fração atingiu os seguintes parâmetros mínimos: volume 0,5 mL, concentração de espermatozoides de  $0,5 \times 10^9$  células/mL, percentual de espermatozoides móveis a 80% e percentual de espermatozoides morfologicamente normais 85%.

### **Preparação do diluidor**

O diluidor Tris-gema (TG) composto de 2,900g de Tris (Merck - 1.08382 - Germany), 1g de glicose (Merck - 1.0024 - Germany), 1,735g de ácido cítrico (Merck - 1.05323 - Germany), 0,06g de penicilina G (Sigma - P 3032 -USA), 0,1g de estreptomicina (Sigma - S 6501 – USA), 15mL de

gema de ovo e 100mL água bidestilada (Santos et al, 2007). Imediatamente após a colheita o ejaculado foi dividido em três alíquotas iguais, sendo a primeira diluída em TG (controle), a segunda em TG + 300 UI de Vitamina E (TGE) e a terceira em TGE + 30µg de Selênio (TGES). Após as diluições, o sêmen foi mantido à temperatura de 35°C em banho-maria numa concentração de aproximadamente  $200 \times 10^6$  espermatozoides (sptz)/mL para primeira avaliação (0 hora = T1) da motilidade progressiva e integridade das membranas plasmática e acrossomal de cada alíquota. Após as alíquotas foram transferidas e mantidas à temperatura de 5°C.

### **Avaliação do sêmen durante a refrigeração**

Uma amostra de sêmen de cada alíquota foi utilizada para a montagem de lâmina/lamínula e aquecida a 37°C para avaliar motilidade e o vigor em microscópio de contraste de fase (CF) em aumento de 100x em 24=T2, 48=T3 e 72=T4 horas.

Para a avaliação da viabilidade das membranas plasmática e acrossomal das alíquotas durante a refrigeração nos mesmos tempos acima descritos, foi utilizada a coloração supravital.

A coloração supravital tripan blue-giemsa hiposmótica (TBGH) foi realizada conforme descrita por Dias (2002) e Santos (2007; 2013). Brevemente, uma alíquota de 20 µL de sêmen foi adicionada a 20 µL da solução azul Tripan 0,2% (0,5 mL água destilada + 0,5 mL 0,4% azul Tripan (Sigma, T 8154 - USA) = 120 mOsm/L (Osmomat®030, Gonotec, Berlin, Germany) em um microtubo de 1,5 mL e incubados em banho-maria por 60 min a 37°C. Em seguida, adicionou-se 1 mL de água bidestilada e a amostra foi centrifugada a 700 giros por 5 min para remover excesso de corante. O sobrenadante foi descartado e ressuspendeu-se a amostra em 0,5 mL de água bidestilada. Três esfregaços foram preparados, secos em um fluxo de ar e fixados em metanol por 5 min. Após secagem, os esfregaços foram corados com Giemsa 10% “overnight”.

Após a lavagem em água bidestilada, as lâminas foram secas em mesa aquecedora. Em cada lâmina foram contados 200 espermatozoides em aumento de 1000x registrando-se a percentagem dos que apresentaram endosmose positiva (cauda enrolada) segundo proposto por REVELL & MRODE (1994). O cálculo do número de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (HO) foi feito por intermédio da fórmula citada por Melo & Henry (1999), onde:  $HO (\%) = (\% \text{ de alterações na região da cauda após HO}) - (\% \text{ de alterações na região da cauda antes do HO})$ . Os espermatozoides foram classificados do seguinte modo:

- Membrana plasmática intacta, reativo ao HO e acrossoma intacto: cabeça rosa ou incolor, cauda enrolada e acrossoma rosa;
- Membrana plasmática intacta, reativo ao HO e acrossoma lesado: cabeça rosa ou incolor, cauda enrolada e acrossoma incolor ou fragmentado;
- Membrana plasmática lesada, não reativo ao HO e acrossoma intacto: cabeça azul ou roxa, cauda estendida e acrossoma rosa;
- Membrana plasmática lesada, não reativo ao HO e acrossoma lesado: cabeça azul ou roxa, cauda estendida e acrossoma incolor ou fragmentado.

Os resultados foram analisados e os dados transformados em arco-seno para melhorar a distribuição dos mesmos. A média e o desvio padrão foram usados para apresentação dos parâmetros do sêmen fresco. Para a avaliação do sêmen refrigerado foi utilizado análise de variância (ANOVA) avaliando os parâmetros entre os tratamentos TG, TGE e TGES por ocasião da diluição e período de refrigeração. Para comparação entre as médias foi empregado o teste de Tukey, considerando um nível de significância de  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos das avaliações do sêmen mantido sob refrigeração,

submetido a diferentes tratamentos, estão apresentados nas tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1. Médias e desvio padrão ( $\pm$ ) da motilidade progressiva de espermatozoides tratados com vitamina E e/ou selênio provenientes de cães da raça Blue Heeler (21 ejaculados).

| Tratamentos | Tempo                      |                            |                            |                            |
|-------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|             | T1                         | T2                         | T3                         | T4                         |
| TG          | 83,57 (3,28) <sup>Aa</sup> | 73,62 (3,81) <sup>Ab</sup> | 56,45 (4,32) <sup>Bc</sup> | 31,58 (4,89) <sup>Bd</sup> |
| TGE         | 83,57 (3,28) <sup>Aa</sup> | 78,56 (3,75) <sup>Aa</sup> | 66,68 (3,89) <sup>Ab</sup> | 52,83 (4,21) <sup>Ac</sup> |
| TGES        | 83,57 (3,28) <sup>Aa</sup> | 78,86 (3,67) <sup>Aa</sup> | 67,16 (4,10) <sup>Ab</sup> | 51,91 (4,35) <sup>Ac</sup> |

<sup>A,B</sup> médias na mesma coluna e <sup>a,b,c,d</sup> na mesma linha indicam diferença significativa  $P < 0,05$ .

A tabela 1 apresenta os parâmetros relacionados com a motilidade progressiva, onde foi detectado que TG (controle) variou significativamente desde T1 a T4 ( $P < 0,003$ ).

TGE e TGES não apresentaram diferença significativa entre T1 e T2, porém, entre T2 e T3 e T3 e T4, corroborando com os relatos de SCHÄFER-SOMI, (2015). Este pesquisador adicionou vitamina E (0,1 mM) ao diluente TRIS- ácido cítrico-frutose, preservou a motilidade progressiva e a viabilidade espermática significativamente melhor durante 72 h quando comparado com a adição de vitamina C ou controle com nenhum antioxidante.

Entre os tratamentos TGE e TGES não foi observado diferença estatística em nenhum dos tempos avaliados mostrando que no presente estudo o selênio não acrescentou qualquer efeito positivo sobre a motilidade dos espermatozoides, não concordando com os relatos de HADDAD & ALVES, (2006). Esta discrepância pode estar relacionada com a concentração utilizada, que no presente foi de 30 $\mu$ g em 100 mL de diluente.

TGE foi significativamente superior ao TG nos tempos T3 ( $P < 0,023$ ) e T4 ( $P < 0,020$ ).

Tabela 2. Médias e desvio padrão ( $\pm$ ) da integridade da membrana plasmática de espermatozoides tratados com vitamina E e/ou selênio provenientes de cães da raça Blue Heeler (21 ejaculados).

| Tratamentos | Tempo                      |                            |                            |                            |
|-------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|             | T1                         | T2                         | T3                         | T4                         |
| TG          | 81,52 (3,38) <sup>Aa</sup> | 69,61 (3,91) <sup>Ab</sup> | 51,45 (4,22) <sup>Bc</sup> | 29,57 (4,91) <sup>Bd</sup> |
| TGE         | 81,52 (3,38) <sup>Aa</sup> | 72,46 (3,66) <sup>Aa</sup> | 62,68 (3,79) <sup>Ab</sup> | 49,82 (4,31) <sup>Ac</sup> |
| TGES        | 81,52 (3,38) <sup>Aa</sup> | 71,86 (3,57) <sup>Aa</sup> | 62,16 (4,11) <sup>Ab</sup> | 49,90 (4,45) <sup>Ac</sup> |

<sup>A,B</sup> médias na mesma coluna e <sup>a,b,c,d</sup> na mesma linha indicam diferença significativa  $P < 0,05$ .

A tabela 2 apresenta os parâmetros relacionados com a integridade da membrana plasmática, onde foi detectado que TG (controle) variou significativamente desde T1 a T4 ( $P < 0,004$ ).

TGE e TGES não apresentaram diferença significativa entre T1 e T2, porém, entre T2 e T3 e T3 e T4, sugerindo que os danos ocorridos nos espermatozoides têm significado estatístico com 48 horas (T3) de refrigeração para as variáveis motilidade (tabela 1) e membrana plasmática (tabela 2).

Entre os tratamentos TGE e TGES não foi observado diferença estatística em nenhum dos tempos avaliados.

TGE foi significativamente superior ao TG nos tempos T3 ( $P < 0,013$ ) e T4 ( $P < 0,018$ ).

Tabela 3. Médias e desvio padrão ( $\pm$ ) da integridade acrossomal de espermatozoides tratados com vitamina E e/ou selênio provenientes de cães da raça Blue Heeler (21 ejaculados).

| Tratamentos | Tempo                      |                            |                            |                            |
|-------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|             | T1                         | T2                         | T3                         | T4                         |
| TG          | 82,57 (3,29) <sup>Aa</sup> | 65,62 (3,82) <sup>Ab</sup> | 50,45 (4,33) <sup>Bc</sup> | 28,48 (4,88) <sup>Bd</sup> |
| TGE         | 82,57 (3,29) <sup>Aa</sup> | 68,56 (3,77) <sup>Ab</sup> | 58,68 (3,90) <sup>Ac</sup> | 44,33 (4,23) <sup>Ad</sup> |
| TGES        | 82,57 (3,29) <sup>Aa</sup> | 67,86 (3,67) <sup>Ab</sup> | 59,16 (4,00) <sup>Ac</sup> | 45,01 (4,25) <sup>Ad</sup> |

<sup>A,B</sup> médias na mesma coluna e <sup>a,b,c,d</sup> na mesma linha indicam diferença significativa  $P < 0,05$ .

A tabela 3 apresenta os parâmetros relacionados com a integridade do acrossoma, onde foi verificado que TG (controle) variou significativamente desde T1 a T4 ( $P < 0,047$ ).

TGE apresentou diferença significativa entre T1, T2, T3 e T4 ( $P < 0,049$ ) bem como o TGES ( $P < 0,050$ ), indicando que os danos ocorridos nos espermatozoides apresentam significado estatístico com 24 horas (T2) de refrigeração para a variável integridade acrossomal (tabela 3), indicando que o acrossoma é muito sensível e ao mesmo tempo essencial para a fertilidade do espermatozoide, concordando com (LINDE-FORSBERG, 1995).

Entre os tratamentos TGE e TGES não foi observado diferença estatística em nenhum dos tempos avaliados.

TGE foi significativamente superior ao TG nos tempos T3 ( $P < 0,034$ ) e T4 ( $P < 0,038$ ).

Avaliando os resultados do presente estudo, concordamos com os achados de

BARROS; TONIOLLI, (2011); MAIA; BICUDO (2009); PENITENTE FILHO (2010), em que a adição de antioxidantes especialmente a vitamina E, prolonga a integridade espermática.

Conclui-se que a adição de vitamina E ao diluidor tris-gema preservou a viabilidade espermática, passível de inseminação artificial por até 72 horas pós-diluição.

A adição de selênio sobre a vitamina E não apresentou efeito positivo, porém, outros estudos com outros antioxidantes bem como suas concentrações, devem ser realizados.

#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S.; ALLAMANENI, S.; What an andrologist/urologist should know about free radicals and why. **Urology**, v.67, n. 1, p.2-8, 2006.

AITKEN, R.J.; FISHER, H. Reactive Oxygen Species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. **Bioessays**, v.16, n.4, p.259-67, 1994.

BARROS, T. B.; TONIOLLI, R. Uso potencial da água de coco na tecnologia de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.35, n.4, p.400-407, 2011. Disponível em: [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br).

CALAMERA, J.C.; FERNANDEZ, P.J.; BUFFONE, M.G.; ACOSTA, A.A.; DONCEL, G.F. Effects of long-term in vitro incubation of human spermatozoa:

functional parameters and catalase effect. **Andrologia**, v.33, n.2, p.79-86, 2001.

GRIVEAU, J.F.; LE LANNOU, D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. **Int. J. Androl.**, v.20, n.2, p.61-9, 1997.

HADDAD, C.M.; ALVES, F.V. Novos conceitos e tecnologias na suplementação mineral de bovinos. II Congresso Latino Americano de Nutrição Animal. **Anais**. 2ed. p.10-13, 2006.

HENRY, M.; NEVES, J.P. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, p.49, 1998.

JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. **Canine and feline therio genology**. Philadelphia: Ray Kersey; 2001.

LINDE-FORSBERG, C. Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen thawed semen in the dog. **Semin. Vet. Med. Surg. (Small. Anim.)**, v.10, n.1, p.48-58, 1995.

LINDE-FORSBERG, C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. **Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.**, v.21, n.3, p.467-85, 1991.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. Editora Sarvier, 4 ed., São Paulo, 2005.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.33, n.4, p.183-193, 2009. Disponível em: [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br).

MELO, M.I.V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.1, p.71-78, 1999.

MICHAEL, A.J.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E.A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.J.; SARATSI, P.; VERVERIDIS, H.N.; BOSCO, C.M. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canines spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.112, n.1-2, p.119-135, 2009.

MOUSTAFA, M.H.; SHARMA, R.K.; THORNTON, J.; MASCHA, E.; ABDEL-HAFEZ, M.A.; THOMAS, A.J.; AGARWAL, A. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. **Human Reproduction**, v.19, n.1, p.129-38, 2004.

NICOLODI, P.R.S.J.; CAMARGO, E.V.; ZENI, D.; ROCHA, R.X.; CYRILO, F.C.; SOUZA, F.N.; LIBERA, A.M.M.D.; BONDAN, C.; LEAL, M.L.R. Perfil protéico e metabolismo oxidativo de cordeiros experimentalmente infectados pelo *Haemonchus contortus* e suplementados com selênio e vitamina E. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.3, p.561-567, 2010.

PENITENTE FILHO, J.M. **Adição da Vitamina E na criopreservação do sêmen caprino**. 41f. Dissertação (Pós- graduação em zootecnia)- UFV, Minas Gerais, 2010.

Disponível em: <http://alexandria.cpd.ufv.br:8000/teses/zootecnia/2010/232205f.pdf>.

REVELL, S.G.; MRODE, R.A. An osmotic resistance test for bovine semen. **Animal Reproduction Science**, v.36, n.1-2, p.77-86, 1994.

SALEH, R.A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practise. **Journal Andrology.**, v.23, n.6, p.737-52, 2002.

SCHÄFER-SOMI. New approaches to semen improvement in dogs. **Revista Brasileira de Reprodução Animal.**, Belo Horizonte, v.39, n.1, p.141-145, 2015.  
Disponível em [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br).