

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**ANÁLISE DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS ESPERMÁTICAS
CONGELADAS DE BOVINOS COM A ADIÇÃO DE ANTIOXIDANTES NATURAIS**

Thamiris Vieira Marsico
Orientador: Dr. Luis Fabiano Santos da Costa

São Gabriel
2016

THAMIRIS VIEIRA MARSICO

**ANÁLISE DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS
ESPERMÁTICAS CONGELADAS DE BOVINOS COM A ADIÇÃO DOS
ANTIOXIDANTES NATURAIS**

Trabalho de conclusão de curso (TCC III)
apresentado ao curso de graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal do
Pampa – Campus SG/RS

Orientador: Dr. Luis Fabiano Santos da Costa

São Gabriel
2016

THAMIRIS VIEIRA MARSICO

**ANÁLISE DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS
ESPERMÁTICAS CONGELADAS DE BOVINOS COM A ADIÇÃO DOS
ANTIOXIDANTES NATURAIS**

Trabalho de conclusão de curso (TCC III)
apresentado ao curso de graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal do
Pampa – Campus SG/RS

Área de concentração: Ciência Animal

Trabalho de conclusão de curso defendido e aprovado em 09 de dezembro de 2016.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luis Fabiano Santos da Costa
Orientador

Vice coordenador do Curso de Bacharelado em Biotecnologia – UNIPAMPA

Prof. Dra. Thais Posser
UNIPAMPA

Prof. Dra. Analía Garnero
UNIPAMPA

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Fabiano Santos da Costa, pelo apoio para que a realização deste trabalho fosse possível. A todo esforço feito por ele para que eu conseguisse superar todos os obstáculos durante a graduação. E por me ensinar que para tudo há um jeito, que não podemos desistir e sim usar a criatividade para buscar outras opções fora da obviedade.

Aos professores Dra. Thaís Posser, Dr. Jeferson Franco, do Grupo de Pesquisa Estresse Oxidativo e Sinalização Celular (GPEOSC) pela disponibilidade de compartilhar materiais e conhecimento durante as etapas do processo.

Em especial, ao meu colega Maikel Gaitkoski pela parceria desde 2011 quando entramos juntos na UNIPAMPA, o meu agradecimento por toda a paciência e o conhecimento compartilhado comigo.

Aos professores Juliano T. Boldo e Paulo Marcos Pinto pelo envolvimento com o curso de biotecnologia, com a vontade de criar uma universidade melhor para todos os estudantes.

A Dra. Patricia Wolker da Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ), pela parceria com os ensaios bioquímicos, por sua generosidade e disponibilidade.

Ao Matheus Dias, pelo companheirismo e ajuda durante toda realização deste trabalho, muito feliz por possui ótimos companheiros no grupo BIOPAMPA.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente, não citadas, contribuíram para o sucesso desta pesquisa.

"There's no such thing as a painless lesson - they just don't exist. Sacrifices are necessary. You can't gain anything without losing something first. Although if you can endure that pain and walk away from it, you'll find that you now have a heart strong enough to overcome any obstacle. Yeah... a heart made Fullmetal".

– Edward Elric, FullmetalAlchemist

RESUMO

Este trabalho baseia-se na valorização da bovinocultura no mercado, pois é preciso que as amostras de sêmen cheguem ao destino final menos danificada possível, para que seja realizada inseminação artificial (IA) com sucesso. Para isso, no processo de criopreservação há a necessidade de utilizar diluentes que protejam a célula espermática. Este trabalho tem por objetivo geral testar diferentes extratos vegetais como agentes antioxidantes no congelamento de sêmen bovino. Além de (a) avaliar os padrões seminais pós-descongelamento na presença de diferentes antioxidantes, (b) avaliar os efeitos dos antioxidantes sobre a motilidade e o vigor das células espermáticas, (c) mensurar o dano de membrana nos espermatozoides através da medida da peroxidação lipídica (TBARS) e (d) mensurar a atividade da enzima antioxidante catalase (CAT). O procedimento iniciou na coleta de sêmen dos machos e seguido do diagnóstico preliminar do sêmen via análise por volume, aspecto, turbilhão, motilidade e vigor sob o microscópio. Em seguida as alíquotas serão separadas em seis grupos para diluição: controle positivo (20% gema de ovo), controle negativo (meio base), tratado com antioxidantes (*Anacardium microcarpum*, *Stryphnodendron adstringens*, *Croton campestris* e *Duguetia furfuraceae*), todos com 6% de glicerol, seguido do congelamento que inclui três etapas: 3h (4°C), 20min em vapor de nitrogênio líquido (N₂) (-70°C) e finalmente a imersão em N₂. Posteriormente as amostras foram descongeladas e analisadas com os mesmos critérios anteriores. Foram utilizados os ensaios bioquímicos de *thiobarbitutic acid reactive substances* (TBARS) e atividade da enzima antioxidante catalase (CAT) para avaliação do dano espermático durante o processo de congelamento do sêmen. Os resultados obtidos demonstram que os extratos vegetais não tenham sido efetivos no melhoramento da congelabilidade dos espermatozoides nesses testes, mas demonstraram comportamentos bioquímicos entre si. O uso de extratos vegetais podem ser tornar uma alternativa viável desde que haja mais estudos para identificar quais extratos podem ter um papel determinante na proteção celular durante congelamento.

Palavras-chave: Criopreservação. Sêmen Bovino. Antioxidantes. Biotecnologia Animal. Reprodução Animal.

ABSTRACT

The importance of this project's achievement is based on the bovine culture appreciation in the market because the semen samples need to reach the final destiny less damaged as possible to be successful used in artificial insemination (AI). Therefore, in the cryopreservation process is necessary to use diluents which protect the spermatic cells. This projects aims to test different plant's extracts as antioxidants agents during cryopreservation in bovine semen. In addition, the evaluation of (a) seminal patterns after thawing in the presence of different antioxidants, (b) the effects of these antioxidants on the motility and sperm vigour, (c) measuring cell damage using TBARS assay and CAT assay. The semen collection started the procedure followed by the preliminary volume, aspect, vortex, motility and vigour analysis under microscope. Furthermore, the samples are separated in six different groups: positive control (20% egg yolk), negative control (basic medium) and groups treated with antioxidants (*Anacardium microcarpum*, *Stryphnodendron adstringens*, *Croton campestris* e *Duguetia furfuraceae*), all the sample were also treated with 6% glycerol, followed by three steps: 3h (4°C), 20 min at nitrogen liquid vapour (N₂) (-70°C) and finally N₂ immersion. Posteriorly, the samples were thawed and analysed with the same previous parameters, besides the biochemical assays TBARS and CAT activity for evaluation of the sperm samples during the cryopreservation process. The results showed the plant's extracts as viable alternative, but more studies are needed to identify which extracts are truly acting as cell protector during the freezing process.

Keywords: Cryopreservation. Bovine Semen. Antioxidants. Animal Biotechnology. Animal Reproduction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema de produtos derivados da bovinocultura.....	11
Figura 2 - Trato reprodutivo do macho (touro).....	12
Figura 3 - Molécula de Glicerol.....	13
Figura 4. Valores dos padrões seminais pós descongelamento.	21
Figura 5. Mensuração da peroxidação lipídica (TBARS) por nmol de malondialdeído MDA/mL.....	23
Figura 6. Mensuração da atividade da enzima catalase (CAT).	24

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Sistema de Criação de Bovinos	10
1.2 Fisiologia da reprodução	11
1.3 Biotécnicas da Reprodução	12
1.4 Antioxidantes	14
2 JUSTIFICATIVA	16
3 OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo geral	17
3.1 Objetivo específicos	17
4 MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 Coleta do Sêmen	18
4.2 Análise do sêmen	18
4.3 Diluição e congelamento do sêmen.....	19
4.4 Análise do sêmen pós-descongelamento	19
4.5 Análise Estatística	20
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	25
REFERÊNCIAS.....	26

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sistema de Criação de Bovinos

A domesticação de animais é umas das atividades mais antigas praticadas pela humanidade, a domesticação bovina data de 10.500 anos atrás devido a necessidade de alimento pois os seres humanos deixaram de ter comportamento de coletores para estabelecerem-se em lugares definidos. Portanto, houve o aumento da demanda de alimento, tanto vegetal como animal e com isso animais foram domesticados e separados em grupos, chamados de rebanhos. O rebanho é composto por bois (machos castrados), as vacas e os touros que são os reprodutores e suas proles, possuindo duas subespécies distintas: *Bos taurus taurus* de origem europeia e *Bos taurus indicus* (zebuínos provenientes da Ásia). O *Bos taurus taurus* descendem do Auroque (*Bos primigenius*), um bovino selvagem primitivo extinto em 1627^{1,2}.

A bovinocultura brasileira é uma potência mundial, envolvendo desde melhoramento genético até a criação destes animais, tanto para produção de leite, carne e muitos outros subprodutos³. Segundo o Instituto brasileiro de geografia e estatística (IBGE), em 2015, o tamanho do efetivo dos rebanhos do Brasil possuía um total de 215,2 milhões de cabeças de gado, onde 13,7 milhões estão somente no Rio Grande do Sul. Em relação a produtos de origem animal, resultados também de 2015 mostraram uma produção de 35 milhões de litros de leite, representando um valor de 34,7 milhões de reais⁴. Já na produção de carne, foram mais de 7,5 milhões de cabeças abatidas no segundo trimestre de 2016⁵. Mas não são só esses produtos provenientes da bovinocultura, pois desta criação pode-se aproveitar outras partes dos animais como pele, esterco, gordura, entre outros. (Figura 1).

Bovinos são animais sociais e vivem em grupos chamados rebanhos, e cada rebanho possui o macho dominante que por sistema poligâmico fertiliza grande parte das fêmeas do grupo. Essa monta natural acontece ao longo de todo o ano, pois as vacas não apresentam sazonalidade reprodutiva, e ao fim da gestação de nove meses obtêm-se geralmente um bezerro macho ou fêmea, que terá o cuidado materno ao longo dos próximos seis meses. Estes animais atingem a maturidade sexual com aproximadamente 1 ano e continuam até os 12 anos, podendo viver até os 20 anos de idade em confinamento².

Figura 1 - Esquema de produtos derivados da bovinocultura.



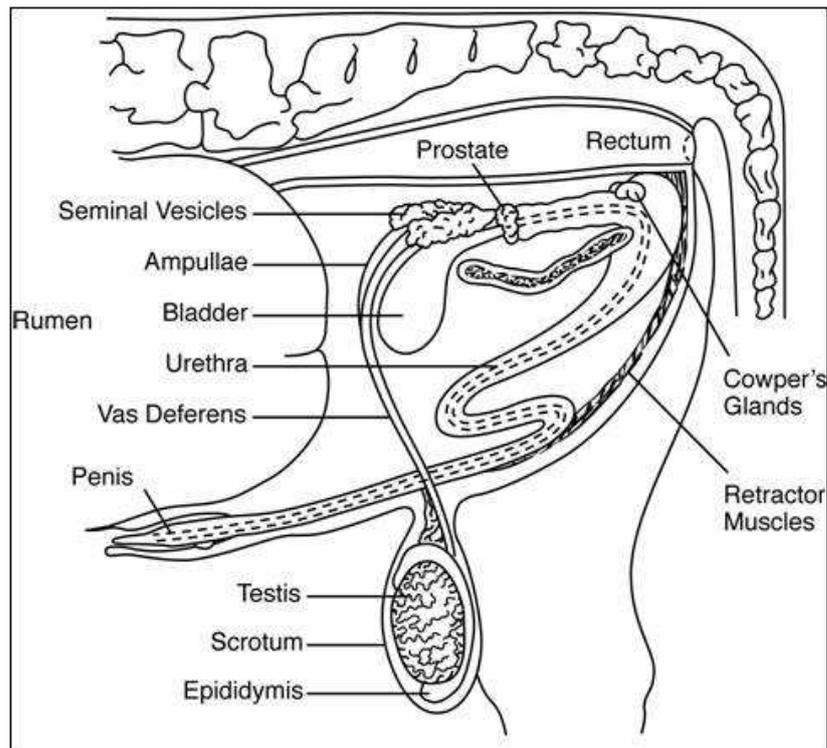
Fonte: AgriBeefCo., traduzida por BeefPoint (<http://www.beefpoint.com.br/cadeia-produtiva/giro-do-boi/conheca-todos-os-produtos-que-sao-feitos-a-partir-de-bovinos-infografico/>)

1.2 Fisiologia da reprodução

O aparelho reprodutor do macho é um complexo de órgãos que atuam em conjunto para produção e liberação de espermatozoides no trato da fêmea. Os touros possuem dois testículos os quais ficam armazenados dentro da bolsa escrotal e funcionam como órgãos primários da reprodução principalmente com a função de produção, que ocorrem dentro dos túbulos seminíferos, das células reprodutivas e do hormônio sexual masculino (testosterona), além de outros como progesterona, estrógeno e colesterol. O epidídimo trata-se de um longo canal composto por três partes (cabeça, corpo e cauda) que proporcionam o ambiente ideal para que os espermatozoides amadureçam durante o percurso além de capacitarem-se para a fertilização. O ducto deferente é uma continuidade da cauda do epidídimo a qual permite a passagem dos espermatozoides para a uretra. As glândulas acessórias são formadas pelo agrupamento das glândulas vesiculares, prostática e bulbouretral, onde basicamente há a produção do plasma seminal responsável como veículo para os espermatozoides, sendo ele

também o responsável pelo volume do ejaculado, onde há um número muito menor de células reprodutivas em relação a quantidade de plasma seminal, além do odor, pH e fornecimento de nutrientes para os espermatozoides. O pênis é o órgão que permite a cópula com a fêmea, envolvido por uma camada de pele (prepúcio) e glândulas que protegem o pênis e o lubrificam^{6,7,8}.

Figura 2 - Trato reprodutivo do macho (touro).



Fonte: The cattle site (<http://www.thecattlesite.com/articles/838/maximizing-beef-bull-fertility-and-reproduction/>).

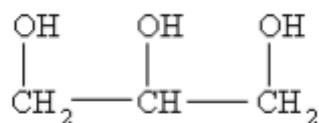
1.3 Biotécnicas da Reprodução

Com os avanços nas biotécnicas de reprodução animal, como inseminação artificial (IA), transferência de embriões (TE) e fertilização *in vitro* (FIV)¹¹, o rebanho bovino brasileiro tem sido melhorado a fim de trazer maior lucratividade para os produtores, aumentando o número de proles obtidas por estação reprodutiva. A IA é uma técnica baseada na introdução de uma parcela de sêmen no trato feminino. Sua denominação é diferenciada pelo local de deposição, sendo muito vantajosa no ponto de vista científico, técnico e zootécnico pois acelera o melhoramento do rebanho possibilitando o uso de touro geneticamente selecionados, ajuda a evitar cruzamentos entre consanguíneos (parentes), possibilita o cruzamento de raças, possibilita a importação de material genético de outras regiões ou países etc^{12,13}. O sêmen utilizado em conjunto com essa técnica pode estar de 3

formas diferentes: fresco, resfriado e congelado. O sêmen fresco é o que oferece números melhores em relação a taxa de gestação, porém o mais inflexível para sua utilização pois há limitações quanto ao tempo de utilização. Sua forma de deposição geralmente é intravaginal e pode ser utilizada mesmo sem adição de diluente, embora deva ser levado em consideração algumas variáveis como: volume do ejaculado, aspecto, número de fêmeas a ser inseminada entre outros. O sêmen resfriado deve ser mantido em temperatura próximo a 4°C e pode ser armazenado até 9 dias, diferente do sêmen fresco que perde muita qualidade espermática quando armazenado, embora quando comparado ao sêmen congelado, o sêmen resfriado após 72 horas começa a perder viabilidade independente do diluente. Além disso outros fatores devem ser observados como: qualidade de amostra inicial, temperatura de armazenamento, diluente e quantidade total de células utilizadas por inseminação. Finalmente, o sêmen congelado apresenta-se como o mais flexível, o que permite que as amostras sejam transportadas por longas distâncias até o momento da inseminação. Entretanto, o sêmen congelado sofre mudanças fisiológicas muito drásticas durante o período de congelamento e descongelamento levando a diminuição das taxas de prenhez a IA. Essa diminuição da qualidade espermática se deve ao estresse físico-químico que os espermatozoides são submetidos, levando a danos como desorganização das membranas celulares¹². O processo de congelamento é feito de maneira gradual e equilibrada, para que as células desidratem, pois do contrário haveria formação de cristais de gelo que acarretaria na morte dos espermatozoides, e ao mesmo tempo evitando a exposição excessiva a altas concentrações de soluto¹⁵.

A criopreservação de sêmen é das biotécnicas mais utilizadas desde que foi descoberta a função da gema de ovo como crioprotetor extracelular¹⁴, num segundo momento o glicerol foi utilizado como crioprotetor das células espermáticas, porém de forma mais efetiva pois a sua ação é intracelular, o que garante um sistema de proteção à célula mais adequado ao processo de resfriamento⁹. O glicerol, possui três grupos hidroxilas que aceitam um hidrogênio da molécula de água em 6 sítios diferentes diminuindo a diferença de osmolaridade do meio de congelamento, pois esta molécula tem livre acesso ao meio interno e externo.

Figura 3 - Molécula de Glicerol.



Fonte: GONZALEZ, 2004.

Os meios de cultura quando submetidos a temperaturas muito baixas, como no caso da criopreservação e como acontece em outras soluções, tendem a formar cristais de gelo intra/extracelular, o que leva ao aumento da pressão osmótica fora da célula devido a concentração de solutos na parte não congelada criando um ambiente inadequado para a sobrevivência celular. Com o glicerol como crioprotetor, durante o processo, esta molécula se liga à fosfolipídios da membrana espermática para estabilização a fim de evitar o rompimento da estrutura¹⁰. Entretanto, a utilização do glicerol é limitada por possuir toxicidade altamente dependente da taxa de resfriamento, velocidade de congelamento, composição do meio diluente e da forma que o glicerol é adicionado à mistura¹⁴.

Outro fator que influencia a qualidade espermática é a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS, de *reactive oxygen species*), radicais livres e oxidantes, termos relacionados a químicos reativos ao metabolismo de oxigênio tendo como representantes principais: o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila ($\cdot OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2)¹⁶. Baixas concentrações de ROS são geradas e degradadas como metabolismo normal das células, como por exemplo a função do peróxido de hidrogênio e o ânion superóxido em processos de fertilização. Entretanto o aumento significativo da concentração dessas espécies afeta o sistema de defesa do espermatozoide que é escasso de líquido citoplasmático, por isso quem faz este papel é o plasma seminal, rico em antioxidantes¹⁷.

1.4 Antioxidantes

Devido aos danos oxidativo causados aos espermatozoides pela criopreservação, alguns aditivos são acrescentados ao diluente para evitar ao máximo a geração de ROS. Algumas plantas naturalmente possuem efeitos antioxidantes como o caju-do-campo (*Anacardium microcarpum*), uma planta nativa do nordeste do Brasil rica em vitamina C, açúcares, minerais e compostos fenólicos, usada popularmente para combate a inflamação, reumatismo, tumores e outra doenças relacionadas a radicais livres/ROS/RNS (*reactive nitrogen species*). *A. microcarpum* possui efeito antioxidante inibindo radicais livres e a peroxidação lipídica em cérebro e fígado de ratos, devido ao seu conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides¹⁸.

O barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) é uma árvore encontrada no cerrado brasileiro¹⁹, que possui uma alta concentração de taninos em sua composição além de outros compostos fenólicos e flavonoides delegando a ele poder antimicrobiano (antisséptico), antioxidante e anti-inflamatório²¹. Esta planta é popularmente utilizada no tratamento de

leucorréia, diarreia, hemorragias e cicatrização de feridas^{20,22}. A atividade antioxidante desta planta se deve a alguns mecanismos que incluem a decomposição de peróxidos, prevenção do sequestro contínuo de hidrogênio que gera as ROS, alta capacidade de redução e eliminação de radicais¹⁹.

Croton campestris, comumente conhecida como Velame-do-campo, é uma espécie também nativa da área do cerrado brasileiro normalmente usada para combater distúrbios gástricos, hematológicos e inflamatórios, assim como, problemas respiratórios. Esta planta é substancialmente conhecida por possuir propriedades antibacterianas, antibióticas, anti-inflamatórias e antioxidantes²³.

Outra planta, frequentemente usada para o tratamento de reumatismo e cólica renal, pertencente à família *Annonaceae*, a Ata-de-lobo (*Duguetia furfuracea*) possui efeito anti-hiperlipidêmico, antibactericida, antitumoral, larvicida, além de funcionar como inibidor de apetite. Os efeitos antioxidantes de *D. furfuracea* estão relacionados com a atividade de compostos fenólicos presentes, principalmente pela captação de radicais livres e função quelante sob os metais de transição para facilitar a eliminação²⁴.

O espermatozoide possui algumas defesas antioxidantes (enzimáticas ou não-enzimáticas) que tem como função a inibição ou redução dos danos causados pela ação danosa das ROS. A superóxido dismutase (SOD) uma metaloproteína que possui cofatores como Cobre (Cu), Zinco (Zn), Manganês (Mn), Ferro (Fe) e Níquel (Ni), presente no citosol e nas mitocôndrias das células eucarióticas. Possui função de proteger as células da ação do ânion superóxido²⁶. A catalase é uma enzima catalisadora da decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio, deixando de ser altamente danoso para a célula espermática²⁷. A glutatona peroxidase age como uma das principais da defesa antioxidante removendo o H_2O_2 . Esta peroxidase reduz o H_2O_2 em H_2O e a glutatona reduzida (GSH) doa hidrogênios para os O_2 remanescentes²⁸.

Os antioxidantes não-enzimáticos são compostos sintéticos que fazem parte de suplementos da dieta alimentar. Geralmente são compostos de baixo peso molecular como o ácido ascórbico (Vitamina C), tocoferol (Vitamina E), ácido úrico, ácido-olipoico, zinco, taurinas, glutatona, entre outros, o qual possuem função de proteger os lipídeos da membrana de degradação e remover radicais peroxil²⁸.

2 JUSTIFICATIVA

O uso de sêmen congelado vem aumentando gradativamente nos últimos anos em decorrência do aumento do uso da Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), uma biotécnica que tem resultado numa aceleração no processo de seleção animal. Um dos grandes gargalos da IATF são os baixos índices de prenhez, em função de uma qualidade de sêmen ainda abaixo do ideal para uso dessa forma. Outra biotecnologia que impacta diretamente na qualidade espermática é a sexagem de espermatozoides, na qual o processamento do sêmen é bastante demorado, causando injúrias irreversíveis às células. Visando identificar possíveis fatores que medeiam os danos aos espermatozoides se faz necessário a identificação de extratos de planta com potencial antioxidante bem definido nesse processo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Testar diferentes extratos vegetais como agentes antioxidantes no congelamento de sêmen em bovinos.

3.1 Objetivo específicos

- Avaliar os padrões seminais pós-descongelamento na presença de diferentes antioxidantes;
- Avaliar os efeitos dos antioxidantes sobre a motilidade e o vigor das células espermáticas;
- Mensurar o dano de membrana nos espermatozoides através da medida da peroxidação lipídica (TBARS);
- Mensurar a atividade da enzima antioxidante catalase (CAT).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta do Sêmen

As amostras utilizadas para os experimentos descritos neste trabalho foram coletadas de 4 touros da raça Brafford, de aproximadamente 24 meses, sexualmente maduros e mantidos em regime extensivo. Os animais foram contidos em tronco de manejo para assegurar a integridade da equipe de coleta e o sêmen foi coletado utilizando eletroejaculador, que consiste de um eletrodo, o qual utiliza uma corrente alternada sobre as glândulas vesiculares para induzir a ejaculação. Esse método é considerado um procedimento de rotina para avaliação de reprodutores pré-estação de monta. Segundo o § 3º do Art. 1º da Lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008 presente nas Normativas do CONCEA, 2º Ed. de 2015, práticas zootécnicas relacionadas a agropecuária como coleta seminal não são consideradas atividades de pesquisa, sendo isentas de aprovação pelo comitê de ética.

4.2 Análise do sêmen

Após a coleta foi avaliado o volume, o aspecto, o turbilhão, a motilidade e o vigor utilizando um microscópio óptico em aumento de 40 a 400 vezes dependendo do parâmetro. As amostras dentro dos padrões seminais adequados foram submetidas ao processo de diluição e início do processo de congelamento. Para isso, foram organizados quatro grupos de tratamento durante o período de pré-congelamento constituídos do meio base contendo Tris (3,187g), ácido cítrico (1,7815g), frutose (1,316g), água destilada 80ml q.s.p. Como crioprotetor foi utilizado 6% de glicerol em todos os tratamentos. Os grupos tratamentos foram constituídos do meio base acrescidos dos diferentes tipos de antioxidantes sendo eles: *Anacardium microcarpum* (Caju-do-campo), *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão), *Croton campestris* (Velame-do-campo), *Duguetia furfuracea* (Ata-de-lobo) em concentração de 10mg/ml (1%), baseado em resultados de Dias et al (2014)²⁵, apresentados na forma de extratos vegetais. Estes extratos foram obtidos a partir de uma parceria com o GPEOSC – Unipampa/SG, *A. microcarpum* e *S. adstringens* são provenientes da casca das plantas, enquanto *C. campestris* e *D. furfuracea* são macerados de folhas. Um grupo controle positivo (C⁺) com a adição de gema de ovo (20%) foi conduzido no intuito de validar o processo de congelamento, entretanto, esse grupo não foi avaliado bioquimicamente quanto às alterações devido à geração de ROS. Além disso um grupo controle negativo (C⁻) constituído apenas do meio básico serviu de parâmetro para a comparação dos demais grupos.

4.3 Diluição e congelamento do sêmen

O sêmen foi congelado em palhetas de 0,5ml sendo previamente diluído nos diferentes meios com uma quantidade de 30 milhões de células espermáticas por palheta. As palhetas dos diferentes grupos foram identificadas e preenchidas com o sêmen diluído sendo posteriormente lacradas e submetidas ao início do processo de congelamento. As etapas de congelamento foram conduzidas de maneira lenta com o objetivo de minimizar a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), porém, por ser um processo agressivo às células, não é possível evitar que ocorra. Na primeira fase, as amostras permaneceram por 3 horas a uma temperatura 4°C (geladeira). Depois disso, as amostras foram submetidas ao contato imediato com vapor de nitrogênio (-70°C) por 20 minutos e ao final do processo foram imersas em nitrogênio líquido (-196°C). As amostras foram acondicionadas em um botijão isocriogênico até o momento das análises laboratoriais, por volta de duas semanas após o congelamento.

4.4 Análise do sêmen pós-descongelamento

Após o processo de congelamento, as amostras foram armazenadas e mantidas em N₂ até o momento das análises. As amostras foram avaliadas quanto aos padrões tradicionais para qualidade de sêmen que utiliza um método subjetivo baseado no percentual de células como movimento progressivo (0-100%) e no vigor que é a força de movimentação do espermatozoide (escala de 0-5). Para o processo de descongelamento, as palhetas são imersas em banho maria a 37°C durante 30 segundos. A peroxidação lipídica foi estimada colorimetricamente pela medição da peroxidação lipídica. Estes níveis no sêmen foram avaliados e determinados medindo as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como descrito por Ohkawa *et al.*, 1979²⁶. Uma alíquota (200 µL) foi misturada com 500 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA, 0,6%), 200 µL de dodecilsulfato de sódio (SDS, 8,1%), e 500 µL de ácido acético (500 mM, pH 3,4) sendo incubado a 100°C durante 1 hora. Níveis de TBARS foram medidos a 532 nm utilizando uma curva padrão de malondialdeído (MDA) e os resultados foram relatados como nmol MDA/mg.

A atividade de catalase (CAT) no sêmen foi avaliado como descrito por Nelson e Kiesow (1972)²⁷ com uma ligeira modificação. O sêmen foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,5 numa proporção 1/5 (p/v). A decomposição de 30 mmol de H₂O₂ foi sistematicamente seguida pela monitorização da diminuição da absorbância a 240 nm. A alteração na absorbância é diretamente proporcional à medida da atividade da CAT. A diminuição na absorção foi seguida durante 3 min e mmol H₂O₂ degradado por minuto e

definido como U/mg de proteína. As determinações de TBARS e CATALASE foram obtidas a partir de triplicatas.

4.5 Análise Estatística

Os resultados são expressos em média mais erro padrão. Os dados foram analisados por ANOVA usando o software GraphpadPrism. As diferenças entre as médias foram avaliadas pelo teste Tukey ($p < 0.05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos padrões seminais avaliados após o descongelamento do sêmen revelaram que o processo de congelamento foi efetivo, pois o grupo controle positivo (contendo gema de ovo) apresentou uma motilidade de 45% e vigor 3, demonstrando que o processo de congelamento, embora com valores abaixo do desejável, foi efetivo em manter células vivas após o descongelamento conforme cita Siqueira *et al.*, 2007⁹. O grupo controle negativo, baseado apenas no meio quimicamente definido, teve os valores para motilidade e vigor diminuídos, ficando com 15% e 1 respectivamente. Já os grupos tratamentos, contendo os antioxidantes tiveram resultados variados onde, *A. microcarpum* e *D. furfuracea* demonstraram valores de motilidade e vigor respectivamente de 10% e 2; e 5% e 1. Os grupos congelados na presença de *S. adstringens* e *C. campestris* não foram efetivos em manter as células vivas apresentando 0% de células vivas e por consequência 0 de vigor, contrariando os resultados de Dias *et al.*, 2014²⁵ que demonstraram ser possível, embora de outra espécie, congelar sêmen de carneiro na presença desses AOXs (Figura 4).

Figura 4. Valores dos padrões seminais pós descongelamento. O controle positivo ratificou o sucesso do processo de congelamento. No controle negativo os valores foram mais baixos pois possuíam apenas glicerol enquanto o controle positivo apresentava glicerol mais a gema de ovo. Entre os tratados A e B ainda mantiveram células míveis, porém C e D causaram a morte de todo o conjunto celular sendo impossível a mensuração de motilidade e vigor. Legenda: A – *A. microcarpum*, B – *S. adstringens*, C – *C. campestris* e D – *D. furfuracea*.

Padrões Seminais	Motilidade	Vigor	
C⁺	45%	3	C⁺ controle positivo
C⁻	15%	1	C⁻ controle negativo
A	10%	2	A <i>A. microcarpum</i>
B	5%	1	B <i>S. adstringens</i>
C	0%	0	C <i>C. campestris</i>
D	0%	0	D <i>D. furfuracea</i>

Fonte: A Autora.

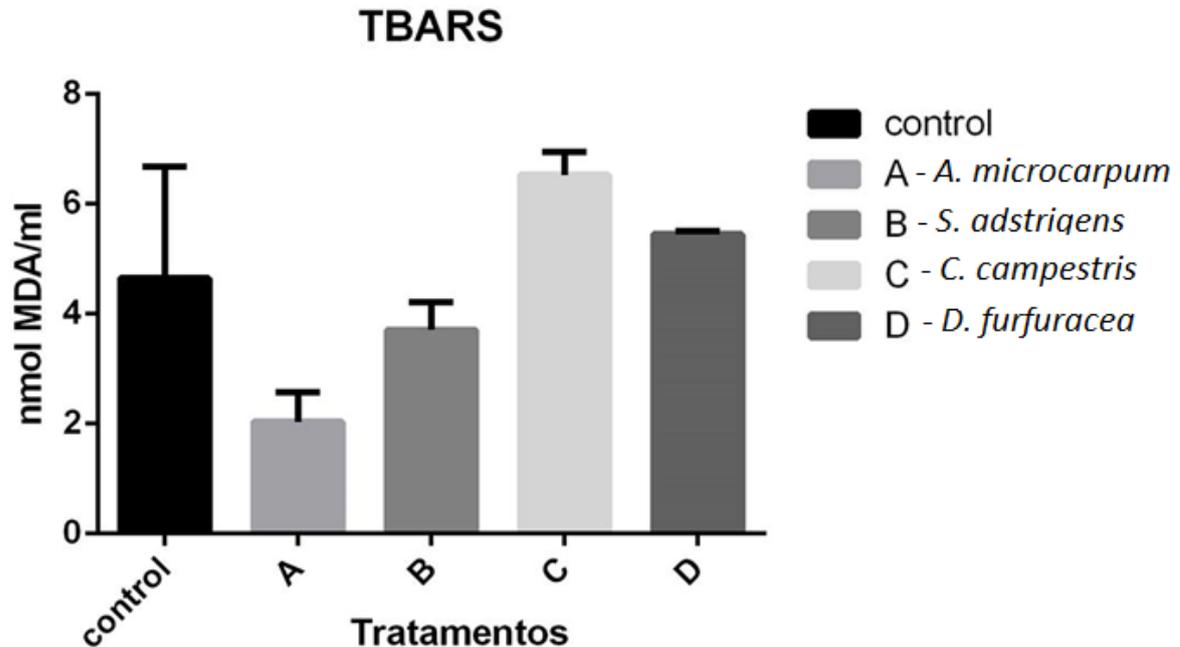
Durante o processo de diluição do sêmen na presença de *A. microcarpum* foi observado a formação de grumos o que também foi observado no grupo *S. adstringens*, no entanto nesse não foi observado sobrevivência de espermatozoides, o que leva a crer que essa

formação grumosa pode ter desencadeado alguma reação celular que causou a morte das células. As células congeladas na presença de *C. campestris* também não sobreviveram, mas diferentemente dos AOX citados anteriormente, não houve formação de grumos.

Os danos na membrana plasmática do espermatozoide determinam efeitos irreversíveis como perda de motilidade e por consequência a capacidade fecundante¹². Isso corrobora com os resultados obtidos, pois a medida que o tempo foi passando durante o processo de congelamento, gradativamente o percentual de células vivas foi diminuindo (dados não mostrados), resultando ao final do processo, valores muito abaixo do encontrado no grupo controle.

Os espermatozoides são susceptíveis a oxidação da membrana plasmática como outras células somáticas devido a presença de ácidos graxos poliinsaturados, a peroxidação lipídica dessa membrana é uma das prováveis causas de lesões que determinam a morte dos espermatozoides¹⁶. Os resultados de TBARS mostram que em todos os grupos analisados houve algum dano de membrana observado pelos valores de TBARS que foram no Controle Negativo $4,65 \pm 1,44$ *A. microcarpum* $2,03 \pm 0,38$, *S. adstringens* $3,71 \pm 0,35$, *C. campestris* $6,53 \pm 0,29$ e *D. furfurace* $5,44 \pm 0,04$, mostrando diferenças significativas pelo teste ANOVA ($p < 0,0001$) figura 5, no entanto pelo teste t não houve diferenças significativas. Pode ser observado que o *A. microcarpum* e o *S. adstringens* apresentaram menores valores na produção de TBARS, levando a ideia de que ambos são capazes de preservar as reações oxidativas no meio. Porém vale ressaltar que o grupo contendo *S. adstringens* não foi capaz de manter células vivas logo após a sua adição ao meio, portanto, os resultados de TBARS para esse grupo podem não se traduzir em uma efetiva proteção às células, uma vez que o processo de geração de ROS possa ter cessado logo após a presença dele ao meio.

Figura 5. Mensuração da peroxidação lipídica (TBARS) por nmol de malondialdeído MDA/mL. Como mostra o gráfico em todos os grupos tratados houve dano celular, mostrando diferenças significativas comprovadas pelo teste estatístico ANOVA, porém no teste dos grupos não apresentaram as diferenças estatísticas. Legenda: A – *A. microcarpum*, B – *S. adstringens*, C – *C. campestris* e D – *D. furfuracea*.

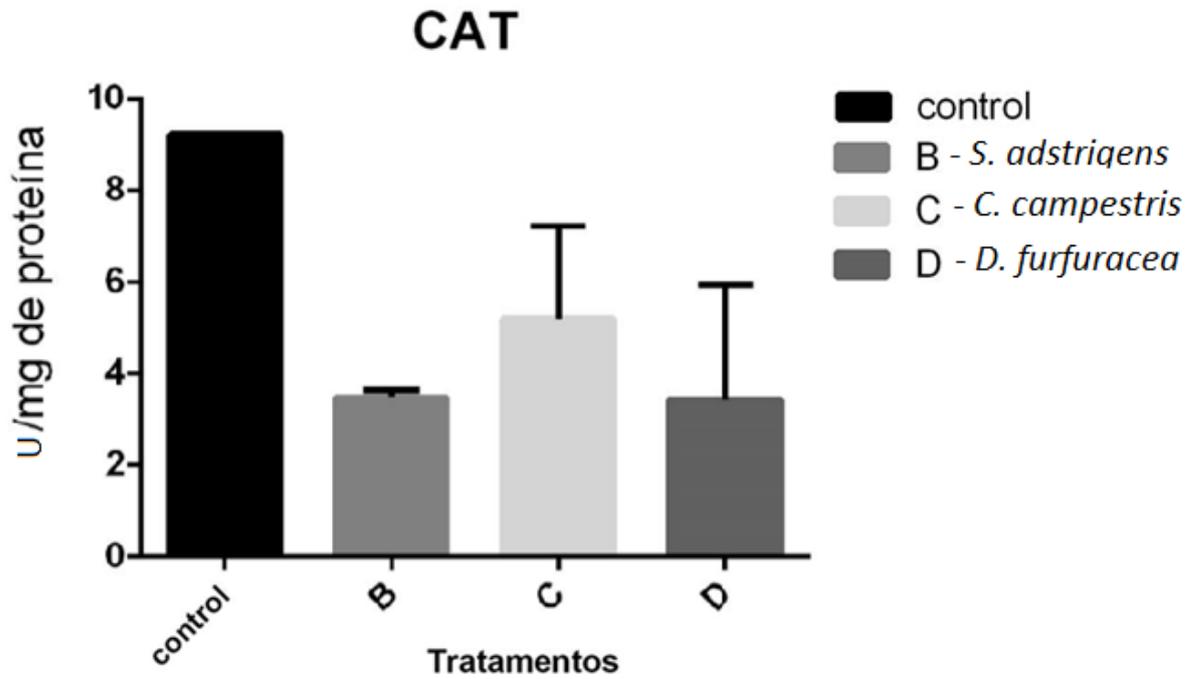


Fonte: A autora.

Por outro lado, os resultados advindos das mensurações dos grupos contendo *C. campestris* e *D. furfuracea*, mostram que a presença desses extratos ao meio de congelamento acabou gerando mais produtos da peroxidação lipídica, mostrando claramente que o fato de não haver células vivas após o descongelamento no grupo tratado com *C. campestris* possa ser associado ao fato de ter gerado mais ROS. Contrariamente a essa linha de raciocínio, o grupo *D. furfuracea*, embora tenha alcançado valores parecidos com o *C. campestris*, foi o extrato que foi capaz de manter células vivas após o descongelamento.

Os resultados da mensuração da enzima CAT demonstram que no grupo controle negativo o valor de referência 9,23 ficou muito acima dos valores dos demais grupos tratados com extratos vegetais, sendo que *D. furfuracea* (3,41) teve o menor valor atividade da enzima CAT dentre os extratos. *C. campestris* (5,21) e *S. adstringens* (3,47) (figura 6), também tiveram valores da atividade da enzima CAT bem abaixo do controle negativo, sendo esses, os extratos que não foram capazes de resultar células vivas após o processo de descongelamento. No entanto, a atividade enzimática foi menor, deixando claro que os extratos evitam o processo de disponibilização de peróxidos no meio para que a CAT atue. O grupo *A. microcarpum* não reagiu ao teste da CAT, portanto as análises estatísticas não foram possíveis de serem realizadas, necessitando novos testes.

Figura 6. Mensuração da atividade da enzima catalase (CAT). Em comparação ao controle negativo, todos os grupos tratados com os extratos vegetais diminuíram a atividade de CAT, sendo *D. furfuracea* o mais efetivo. O grupo *A. microcarpum* não reagiu com a CAT, impossibilitando análises estatísticas, sendo necessário futuros testes. Legenda: B – *S. adstrigens*, C – *C. campestris* e D – *D. furfuracea*.



Fonte: A autora.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora os resultados com a utilização de extratos vegetais não tenham sido efetivos na capacidade de melhorar o resultado de congelabilidade de células espermáticas de bovinos, ficou evidente que os diferentes extratos vegetais utilizados nesse trabalho, quando adicionados ao meio de congelamento, demonstraram comportamentos bioquímicos diferentes entre si.

O uso de extratos vegetais adicionados ao meio de congelamento pode ser uma alternativa viável, no entanto, mais estudos devem ser conduzidos para identificar quais extratos podem ter um papel determinante na prevenção dos danos de membrana no espermatozoide.

REFERÊNCIAS

- 1- WILHAM, J. **A genômica bovina – origem e evolução de taurinos e zebuínos.** Veterinária e Zootecnia, 2013.

- 2- NG J.; DEWEY, T. **Bos taurus Online.** Animal Diversity Web, 2001. Disponível em: http://animaldiversity.org/accounts/Bos_taurus/#9ff6846bebdec39e16d3efcc03b0f0cd. Acesso em: 11/10/2016.

- 3- BRASIL. **Bovinos e bubalinos.** Ministério da Agricultura, 2004. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>. Acesso em: 20/10/2016.

- 4- BRASIL. **Banco Sidra.** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2015. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=5&z=t&o=24&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1>. Acesso em: 14/11/2016

- 5- BRASIL. **Banco Sidra.** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2015. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=4&z=t&o=24&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1>. Acesso em: 14/11/2016

- 6- TURMAN, E. J; RICH T.D. **Beef Cattle Handbook.** Product of extension beef cattle resource committee, 2010.

- 7- NUNES, P. **Fisiologia reprodutiva do macho.** Disponível em: <http://docplayer.com.br/8120953-Fisiologia-reprodutiva-do-macho-bovino.html>. Acesso em: 13/11/2016.

- 8- HAMILTON, T. **Maximizing beef bull fertility and reproduction.** The Cattle Site, 2007.

- 9 – SIQUEIRA, J. B; GUIMARÃES, J. D; COSTA, E. P; HENRY, M; TORRES, C. A. A; SILVA, M. V. G. B; SILVEIRA, T. S. **Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática *in vitro***. Revista Brasileira de Zootecnia, 2007.
- 10- GONZALEZ, R. A. F. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozoide bovino**. Pirassununga, 2004.
- 11- INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM BOVINOS. Beef Point, 2003. Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br/radares-tecnicos/reproducao/inseminacao-artificial-em-bovinos-6987/>>. Acesso em: 20/10/2016.
- 12- MORRIS, L. H. A; HUNTER, R. H. F; ALLEN W. R. **Hysteroscopic insemination of small number of spermatozoa at the uterotubal junction pf preovulatory mares**. Journal of Reproduction and Fertility, 2000.
- 13- EMBRAPA. **Inseminação artificial (IA)**. Embrapa Gado de Leite, 2011.
- 14- SALAMON, S; MAXWELL W. M. **Storage of ram semen**. Animal Reproduction Science, 2000.
- 15- GONÇALVES, N. M; NEVES, M. M. **Sêmen fresco, resfriado ou congelado: existe diferença entre eles?.** Espaço do Produtor, 2011.
- 16- AITKEN, R. J. **Free radicals, lipid peroxidation and sperm function**. Reproduction Fertility Development, 1995.
- 17- MAIA, M. S; BICUDO, S. D. **Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão**. Revista Brasileira de Reprodução Animal. Belo Horizonte, 2009.
- 18- FILHO, V. M. B; WACZUK, E. P; KAMDEM, J. P; ABOLAJI, A. O; LACERDA, S. R; COSTA, J. G. M; MENEZES, I. R. A; BOLIGON, A. A; ATHAYDE, M. L; ROCHA, J. B. T; POSSER, T. **Phytochemical constituents, antioxidante activity, cytotoxicity and**

osmotic fragility effects of caju (*Anacardium microcarpum*). Industrial Crops and Products, 2014.

19- FILHO, P. R. S; FERREIRA, L. A; GOUVÊA, C. M. C. P. **Protective action against chemical-induced genotoxicity and free radical scavenging activities of *Stryphnodendron adstringens* (“barbatimão”) leaf extracts.** Revista brasileira de Farmacognosia, 2011.

20- NASCIMENTO, A. M; GUEDES, P. T.; CASTILHO, R. O; VIANNA-SOARES, C. D. ***Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) proanthocyanidins quantitation by RP-HPLC.** Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013.

21- MACEDO, F. M; MARTINS, G. T; RODRIGUES, C. G; OLIVEIRA, D. A. **Triagem fitoquímica do Barbatimão *Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville].** Revista brasileira de Biociências, 2007.

22- SOUZA, T. M; SEVERO, J. A; SILVA, V. Y. A; SANTOS E; PIETRO, R. C. L. R. **Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosidae).** Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 2007.

23- JÚNIOR, F. E. B; OLIVEIRA, D. R; BOLIGON, A. A; ATHAYDE, M. L, KADEM, J. P; MADEDO, G. E; SILVA, G. F; MENEZES I. R. A; COSTA J. G. M; COUTINHO, H. D. M; KERNTOPF, M. R; POSSER T. **Protective effects os *Croton campestris* A. St-Hill in diffente ulcer models in rodents: Evidence for the involvement of nitric oxide and prostaglandins.** Journal of Ethnopharmacology, 2014.

24- PINHO, F. V. S. A; CRUZ, L. C; RODRIGUES, N. R; WACZUK, E. P; SOUZA, C. E. S; COUTINHO, H. D. M; COSTA, J. G. M; ATHAYDE, M. L; BOLIGON, A. A; FRANCO, J. L; POSSER, T; MENEZES, I. R. A. **Phytochemical Composition, Antifungal and antioxidante activity of *Duguetia furfuracea* A. St.-Hill.** Oxidative medicine and cellular longevity, 2016.

25- DIAS, M. O; GUIMARÃES F. F; ROSSO, I. R. D; ZENKER, S. G; COSTA, L. F. S. **Estresse oxidativo em espermatozoides de carneiro (Resultados parciais)**. Anais do VI Salão de Ensino, Pesquisa e Extensão. V.6, n 2, 2014.

26- OHKAWA, H; OHISHI N; YAGI, K. **Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric reaction**. Analytical Biochemistry, 1979.

27- NELSON, D. P; KIESOW, L. A. **Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV)**. Analytical biochemistry, 1972.

28 – STUMM, A. M. G. **Estresse oxidativo sanguíneo e seminal em equinos**. Universidade de Cruz Alta. UNICRUZ, 2016.