

MARIA CLÉCIA MACHADO COSTA

**EFEITO DO EXTRATO DE *Abarema cochliacarpus* NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN OVINO**

GARANHUNS-PE

2018

MARIA CLÉCIA MACHADO COSTA

**EFEITO DO EXTRATO DE *Abarema cochliacarpus* NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN OVINO**

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Medicina Veterinária da Unidade Acadêmica
de Garanhuns, Universidade Federal Rural de
Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para
obtenção do título de graduação em Medicina
Veterinária.**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro

CO-ORIENTADORA: Prof^ª. Dra. Taciana Rabelo Ramalho Ramos

GARANHUNS-PE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Ariano Suassuna, Garanhuns - PE, Brasil

C837e Costa, Maria Clécia Machado

Efeito do extrato de *Abarema cochliacarpus* na
criopreservação de sêmen ovino / Maria Clécia
Machado Costa. - 2018.

44f.

Orientador(a): Gustavo Ferrer Carneiro.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina
Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Departamento de Medicina Veterinária, Garanhuns, BR-PE, 2018.

Inclui referências

1. Oxidação 2. Espermatozóides 3. Ovino - Reprodução
I. Carneiro, Gustavo Ferrer, orient. II. Título

CDD 636.3

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DO EXTRATO DE *Abarema cochliacarpos* NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN OVINO**

Trabalho de conclusão de curso elaborado por:

MARIA CLÉCIA MACHADO COSTA

Aprovada em 02 / 08 / 2018

BANCA EXAMINADORA

ORIENTADOR: Prof. Dr. GUSTAVO FERRER CARNEIRO
Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE

CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dra. TACIANA R. R. RAMALHO
Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE

Médico Veterinário Msc. BRENO BARROS DE SANTANA
Universidade Federal Rural de Pernambuco



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS

FOLHA COM A IDENTIFICAÇÃO DO ESO

I. ESTAGIÁRIO

NOME: MARIA CLÉCIA MACHADO COSTA MATRÍCULA Nº 095.782.544-74

CURSO: MEDICINA VETERINÁRIA PERÍODO LETIVO: 2018.1

ENDEREÇO PARA CONTATO: Sítio Varginha, s/n, zona rural, Iati-PE

FONE: (87) 9 8116-5567

ORIENTADOR: PROF. DR. GUSTAVO FERRER CARNEIRO

CO-ORIENTADORA: PROF^ª. DRA. TACIANA RABELO RAMALHO RAMOS

SUPERVISOR: PROF. DR. EDILSON SOARES LOPES JÚNIOR

FORMAÇÃO: MÉDICO VETERINÁRIO

II. EMPRESA/INSTITUIÇÃO

NOME: UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO

ENDEREÇO: ROD. BR 407, KM 12-LOTE 543-PROJETO DE IRRIGAÇÃO
SENADOR NILO COELHO, S/N

CIDADE: PETROLINA ESTADO: PERNAMBUCO

CEP: 56300-990

FONE: (87) 2101-4816

III. FREQUÊNCIA

INÍCIO E TÉRMINO DO ESTÁGIO: 05 / 04 / 2018 a 21 / 05 / 2018

TOTAL DE HORAS ESTAGIADAS: 256 horas

IV. COMPLEMENTAÇÃO DA CARGA HORÁRIA

INÍCIO E TÉRMINO DO ESTÁGIO: 23 / 05 / 2018 a 19 / 06 / 2018

TOTAL DE HORAS ESTAGIADAS: 152 horas

LOCAL: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

SUPERVISOR: PROF. DR. ANDRÉ MARIANO BATISTA

AGRADECIMENTOS

Considero uma parte extremamente delicada de escrever, pois jamais conseguirei expressar em palavras a importância que cada um tem em minha vida.

Agradeço, primeiramente, à Deus por ter me concedido o Dom da Vida e por ter me abençoado durante esta árdua caminhada.

Agradeço à minha família que sempre esteve comigo nos momentos mais difíceis, principalmente a minha mãe (Maria do Carmo) que se fez presente em cada momento decisivo, sempre disposta a me ajudar.

Agradeço ao meu namorado (Petrônio Lemos) que apesar da distância se fez presente em todos os momentos me apoiando, me aconselhando. Obrigado amor por cuidar tão bem de mim!

Agradeço à todos que fazem parte da equipe LAFIBRA e ANDROLAB em especial aos meus supervisores professor Edilson Lopes e Dr. André Mariano Batista. Que proporcionaram a realização do meu estágio nos referidos laboratórios. Onde pude vivenciar diferentes experiências e conviver com profissionais que fazem a pesquisa acontecer. Obrigado à todos! Aprendi muito com cada um de vocês (Univasf: Bruna Bastos, Elaine Feitoza, Laisa Medeiros, Fernando Pintó, Rita Kayla, Isadora Ribeiro; UFRPE: Robespierre Araújo, Joana Amélia, Millena Maria e Flávio Mergulhão).

Agradeço ao meu orientador Professor Gustavo Ferrer Carneiro pela atenção e ensinamentos.

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste ESO!

RESUMO

Diante da crescente utilização de biotécnicas na reprodução animal visando melhoramento do rebanho ovino, ocorre em paralelo à necessidade de buscar-se alternativa para melhoria da formulação de meios crioprotetores, pois o sêmen criopreservado tem como vantagem sua conservação por período de tempo indeterminado, com capacidade fecundante, e por ser transportado por longas distâncias, difundindo material genético de qualidade comprovada. Contudo, a ocorrência de crioinjúrias oxidativas durante o processamento de criopreservação altera a qualidade espermática, reduzindo-a drasticamente. Para tanto o uso de diluentes contendo antioxidantes visa diminuir essas alterações sofridas pelas células espermáticas. Recentemente, pesquisas vêm apontando para o uso de extratos fitoterápicos como uma alternativa de antioxidante para utilização em meios de criopreservação, no entanto, mais pesquisas são necessárias para determinação de quais extratos são mais eficazes. A *Abarema cochliacarpus*, é uma espécie vegetal pertencente à família *Fabaceae*, contendo em sua composição química, catequinas (seus dímeros e trímeros), saponinas, taninos e proantocianidinas. Pesquisas tem demonstrado uma ação antioxidante, anti-inflamatória, anti-ulcerogênica e cicatrizante. Para tanto, o objetivo deste trabalho foi testar o efeito do extrato desta planta na criopreservação de sêmen ovino. Diante disso, foram utilizados dois ovinos, mestiços, em idade reprodutiva, sendo coletado o sêmen (3 repetições) e congelados com a adição do extrato ao diluente de criopreservação nas seguintes concentrações: 0 (Controle), 2,5mg; 1,25mg; 0,67mg; 0,31mg e 0,2 mg; sendo submetido ao congelamento, com posterior avaliação dos parâmetros cinéticos no sistema computadorizado CASA, avaliando-se também a integridade da membrana plasmática e do potencial de membrana mitocondrial. Na avaliação do CASA houve diferença significativa entre os tratamentos quando avaliados os parâmetros de MP, LIN, STR e BCF com um destaque para a concentração de 1,25mg do extrato de *Abarema cochliacarpus*. Não houve diferença estatística entre os tratamentos na integridade de membrana ou no potencial mitocondrial. Esses resultados indicam que não houve um efeito adverso do *Abarema cochliacarpus* na integridade de membrana plasmática ou potencial mitocondrial nas diferentes concentrações desse experimento. Conclui-se que o extrato fitoterápico da *Abarema cochliacarpus* pode ser usado na criopreservação de sêmen ovino, no entanto mais estudos serão necessários para mensurar a concentração adequada do extrato para que este desempenhe o papel antioxidante esperado.

Palavras-chave: Oxidação, espermatozóides, animal, antioxidante.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Instalações do Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal.....	14
Figura 2. Sala para produção in vitro de embriões	14
Figura 3. Atividades realizadas na Embrapa durante experimento.....	16
Figura 4. Aferição da osmolaridade.....	17
Figura 5. Atividades realizadas no laboratório durante experimento.....	17
Figura 6. Apresentação de seminário.....	18
Figura 7. Instalações do laboratório de Andrologia-DMV/UFRPE.....	19
Figura 8. Equipamentos do laboratório.....	19
Figura 9. Coleta de sêmen.....	21
Figura 10. Avaliação de sêmen.....	21
Figura 11. Avaliação espermática com fluorescência.....	22
Figura 12. Diagnóstico de prenhes com uso da ultrassonografia.....	22

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1.	Atividades desenvolvidas e/ou acompanhadas, no LAFIBRA, no período de 5 de abril a 21 de maio de 2018.....	15
Tabela 2.	Atividades desenvolvidas e/ou acompanhadas, no LAFIBRA, no período de 23 de maio a 19 de junho de 2018.....	20
Tabela 3.	Valores médios pós-descongelamento de sêmen ovino com adição do extrato vegetal, com avaliação no sistema computadorizado CASA.....	39
Tabela 4.	Valores médios da avaliação de Integridade de membrana plasmática (IMP) e potencial de membrana mitocondrial (PMM) através de sondas fluorescentes.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS - 2,2'-azino-bis- (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)

ALH - Amplitude de deslocamento lateral da cabeça

BCF - Frequência de Batimento Flagelar Cruzado

CAT - Catalase

CIV - Cultivo *in vitro*

DCF - Diacetato de Carboxifluoresceína

DMSO - Dimetilsulfóxido

DPPH - α -difenil- β -picril-hidrazila

FIV - Fertilização *in vitro*

GPx - Glutathione peroxidase

HDL - Lipoproteína de Alta Densidade

HO₂ - Hidroperoxila

H₂O₂ - Superóxido de Hidrogênio

IP - Iodeto de Propídeo

IMP - Integridade da Membrana Plasmática

JC-1 - Iodeto de 5,5',6,6' tetracloro- 1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolil

LIN - Linearidade

MIV - Maturação *in vitro*

MT - Motilidade Total

MP - Motilidade Progressiva

O₂⁻ - Superóxido

OH - Hidroxila

PMM - Potencial da membrana mitocondrial

SOD - Superóxido Dismutase

STR - Retilinearidade

VAP - Velocidade média da trajetória

VCL - Velocidade curvilínea

VSL - Velocidade em linha reta

WOB - Wobble ou índice de oscilação

SUMÁRIO

	Página
Capítulo I – Descrição do local de estágio e atividades realizadas	
1. DESCRIÇÕES DOS LOCAIS DO ESO	13
1.1 Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal (LAFIBRA).....	13
1.1.1 Atividades desenvolvidas no LAFIBRA.....	15
1.2 Laboratório de Andrologia do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE (ANDROLAB).....	18
1.2.1 Atividades desenvolvidas no ANDROLAB.....	20
Capítulo II – PESQUISA CIENTÍFICA	
1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1 Sêmen.....	24
2.1.1 Espermatozoides e membrana plasmática.....	24
2.1.2 Capacitação espermática e reação acrossômica.....	25
2.2 Conservação seminal.....	25
2.2.1 Refrigeração.....	25
2.2.2 Criopreservação do sêmen.....	26
2.3 Espécies reativas de oxigênio (ERO).....	27
2.4 Peroxidação lipídica.....	28
2.5 Diluentes.....	28
2.5.1 Água de coco em pó (ACP-102).....	29
2.5.2 Tris (tris-(hidroximetil)aminometano) e suas associações.....	30
2.6 Crioprotetores.....	30
2.6.1 Glicerol.....	30
2.7 Métodos de avaliação do sêmen.....	31
2.7.1 Sistema computadorizado de avaliação espermática(CASA).....	32
2.7.2 Integridade de membrana plasmática (IPM).....	33
2.7.3 Pontencial de membrana mitocondrial (PMM).....	33
2.8 Uso de antioxidantes fitoterápicos na criopreservação de sêmen ovino.....	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1 Animais, local e período do experimento.....	36

3.2	Preparo do extrato.....	36
3.3	Coleta do sêmen.....	36
3.4	Avaliação do sêmen fresco.....	37
3.5	Adição do extrato ao sêmen.....	37
3.6	Congelamento do sêmen.....	37
3.7	Avaliação pós-descongelamento do sêmen.....	37
3.7.1	Computer assisted sperm analysis (CASA).....	37
3.7.2	Integridade da membrana plasmática (IMP).....	38
3.7.3	Potencial da membrana mitocondrial (PMM).....	38
3.8	Análise estatística.....	38
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.	CONCLUSÃO.....	40
	REFERÊNCIAS.....	41
	ANEXOS.....	44

CAPÍTULO I – DESCRIÇÃO DO LOCAL DO ESO E ATIVIDADES REALIZADAS

1. DESCRIÇÃO DOS LOCAIS DO ESO

O Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) foi realizado em dois períodos distintos. No período de 5 de abril a 21 de maio de 2018, com carga horária de 256 horas, essa parte do ESO foi realizado na **Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), no Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal (LAFIBRA)**, sob supervisão do **Professor Dr. Edilson Soares Lopes Júnior**. Em seguida, especificamente no período de 23 de maio a 19 de junho de 2018, e com carga horária de 152 horas, as atividades referentes ao ESO fora executadas na **Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), no Laboratório de Andrologia do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE (ANDROLAB)**, sob supervisão do **Professor Dr. André Mariano Batista**. Todo o ESO, seja na UNIVASF ou na UFRPE foi sob orientação do **Professor Dr. Gustavo Ferrer Carneiro**, o qual está lotado na UAG/UFRPE.

1.1 Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal (LAFIBRA)

O LAFIBRA fica situado no município de Petrolina, localizado na Rodovia BR 407, Km 12- Lote 543- Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho a 719 km da capital Pernambucana Recife. O laboratório é composto por diversas salas onde são executadas atividades específicas. Neste contém: sala para coleta de sêmen, sala de avaliação e processamento de sêmen, sala de preparo de fêmeas e Ultrassonografia, sala de colheita e manipulação de oócitos, sala de acesso a sala de PIV para paramentação, sala de Produção *in vitro* de embriões, sala de manipulação e criopreservação de embriões e a sala de colheita e transferência de embriões (Figuras 1 e 2). Além disso, conta com banheiros, saídas de emergências, copa, salas dos professores e de uma sala para os alunos de graduação e mestrado que estão desenvolvendo seus projetos no laboratório.



Figura 1: Instalações do Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal. Sala de preparo de fêmeas e Ultrassonografia (A); Sala de colheita de sêmen (B); Sala de avaliação e processamento do sêmen (C); Sala de colheita e manipulação de oócitos (D). Fonte: Arquivo pessoal.

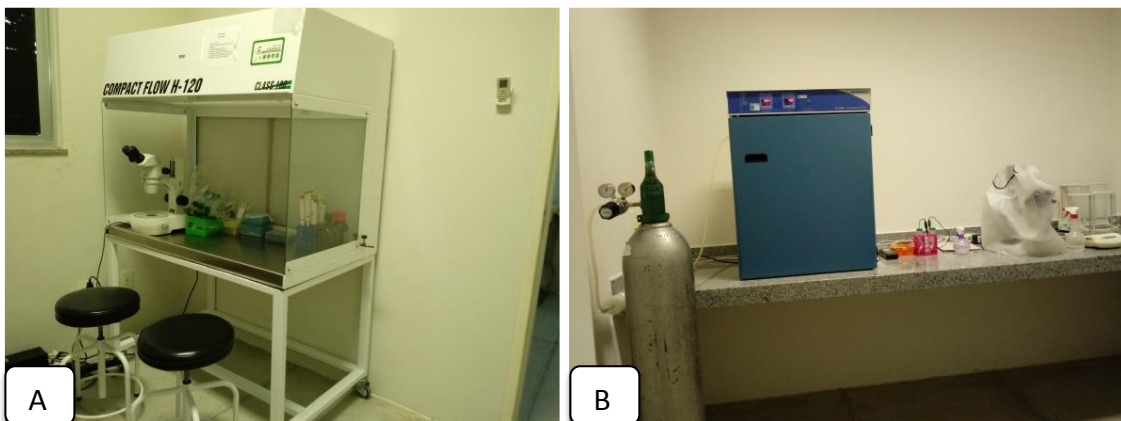


Figura 2: Sala para Produção *in vitro* de embriões. Fluxo laminar (A); Bancada com estufa, balança analítica, pHmetro e microscópio invertido (B). Fonte: Arquivo pessoal.

Atualmente, o LAFIBRA conta com uma equipe formada pelos alunos de Mestrado Bruna Bastos (Médica Veterinária), António Fernando Pinto (Engenheiro Agrônomo), Elâine Rosa Feitoza (Zootecnista), Laisa Ribeiro (Médica Veterinária) e de graduação Priscila Gonçalves (Ciências Biológicas), Maria Naiara Silva (Ciências Biológicas), Rita Kayla Sousa (Medicina Veterinária) e Isadora Lima (Zootecnia). A equipe de estudantes realiza suas atividades acadêmicas sob a orientação do Professor Dr. Edilson Soares Lopes Júnior e co-

orientação da Professora Dra. Mabel Freitas Cordeiro. As atividades realizadas foram todas relacionadas com os projetos em execução no laboratório, além de aulas práticas para as turmas das disciplinas de Biotecnologias da Reprodução Animal (Medicina Veterinária) e Biotecnologia da Reprodução (Zootecnia).

1.1.1 Atividades desenvolvidas no LAFIBRA

Várias atividades foram realizadas e/ou acompanhadas durante o período de estágio (Tabela 1), tendo como finalidade a execução do experimento de mestrado intitulado “Efeito do uso da Somatotropina Bovina Recombinante rBST sobre a produção e maturação *in vitro* de oócitos bovinos da raça Sindi”, conduzido pela mestranda Laisa Ribeiro e do projeto de iniciação científica intitulado “Efeito da suplementação de estrógeno na produção *in vitro* de embriões ovinos”, conduzido pela discente Priscila Gonçalves.

Tabela 1. Atividades desenvolvidas e/ou acompanhadas, no LAFIBRA, no período de 5 de abril a 21 de maio de 2018

Atividades	Espécie	
	Bovina	Ovina
Formulação de meios para PIV	0	5
Avaliação da osmolaridade dos meios da PIV	0	3
Coleta de ovários em abatedouro (Juazeiro/BA)	0	1
Aspiração folicular com bomba a vácuo	1	3
Avaliação e seleção dos oócitos	1	3
Avaliação da maturação oocitária	1	3
Fertilização <i>in vitro</i>	1	2
Coleta e avaliação de sêmen	0	3
Total	4	23

No experimento da mestranda Laisa Ribeiro, a etapa de aspiração folicular foi realizada *in vivo*, ou seja, por Ovum Pick-Up guiada por Ultrassonografia (OPU) de vacas da raça Sindi. Os animais se encontravam na estação experimental da Embrapa Semiárido, localizada a cerca de 40Km do LAFIBRA. Na estação experimental eram realizadas as etapas de aspiração folicular e seleção dos oócitos (Figura 3). Depois, os oócitos selecionados eram colocados em meio de seleção e transportados em caixa térmica de transporte de oócitos até o laboratório, onde se realizava a adição dos oócitos em gotas de meio de maturação, adquirido

de empresa comercial e incubados em estufa de cultivo a 38,5°C a 5% de CO₂ e atmosfera umidificada. A partir de então, foi iniciada a maturação oocitária *in vitro* (MIV) por 24 horas. Em seguida, era realizada a avaliação da maturação oocitária, e usando leves pipetagens eram removidas as células cumulus dos oócitos, preparando os oócitos para a fertilização *in vitro* (FIV). Para a FIV foi utilizado sêmen criopreservado, que após descongelamento, era selecionado através do gradiente de Percoll. Eram preparadas gotas com meio FIV e, nestas adicionados os oócitos maturados e os espermatozoides selecionados, e incubados novamente. Após 48 horas, realizava-se a avaliação da taxa de fertilização.



Figura 3: Atividades realizadas na Embrapa durante experimento. Aspiração folicular com bomba a vácuo via transvaginal guiada por ultrassom (A); bancada organizada para realização da seleção de oócitos (B). Fonte: Arquivo pessoal.

No projeto de iniciação científica da discente Priscila Gonçalves com PIV ovina, os meios foram formulados no laboratório, pois estava se testando o uso de estradiol no meio de maturação *in vitro* em diferentes concentrações e, devido a isso foi necessário realizar a aferição da osmolaridade e pH dos meios, após a sua confecção. A aferição do pH era realizada na própria sala de PIV, onde eram formulados os meios, mas, para aferir a osmolaridade era necessário ir ao Centro de Pesquisas em Suínos, Espécies Nativas e Silvestres (CEPSENS), de responsabilidade técnica da Professora Dra. Elenice Moraes. Na aferição (Figura 4), as correções de osmolaridade eram realizadas quando o meio se encontrava com valores acima de 300 Osmol/L o que era considerado fora do padrão para ocorrer a maturação *in vitro* de oócitos.

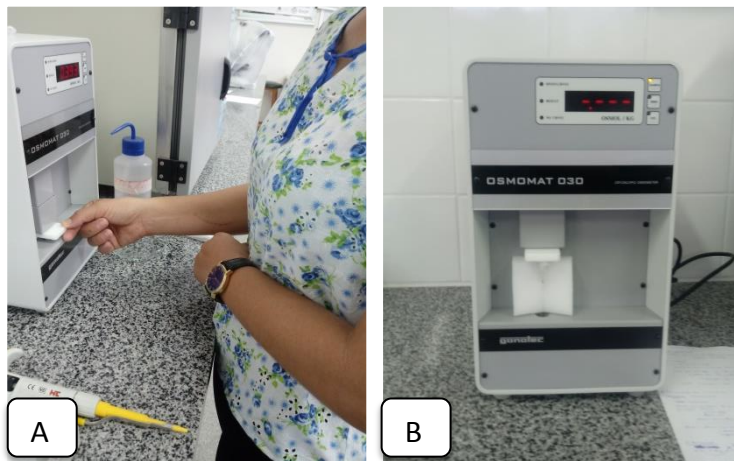


Figura 4: Aferição da osmolaridade. Manuseio do Osmômetro (A), aparelho em funcionamento (B).
Fonte: Arquivo pessoal.

Os ovários eram obtidos do abatedouro Campo Gado, localizado em Juazeiro/BA e transportados em solução salina suplementada com antibiótico, a temperatura compreendida entre 35 e 37°C. Chegando ao laboratório, era realizada a etapa de aspiração com bomba a vácuo, seleção dos oócitos e incubação em meio de maturação. A etapa de Fertilização *in vitro* foi realizada com sêmen fresco coletado, avaliado, selecionado através de centrifugação em gradiente de Percoll (45/90%) e imediatamente antes da realização da FIV. Neste experimento pude acompanhar a ida ao abatedouro, a formulação e confecção dos meios e correção da osmolaridade dos mesmos, das etapas de Seleção, MIV, FIV e CIV (Figura 5), além do preparo do sêmen para FIV.



Figura 5: Atividades realizadas no laboratório durante experimento. Coletas de ovários no abatedouro (A); Seleção dos oócitos (B); Preparação de meios para seleção oocitária, MIV, FIV e CIV(C); Fonte: Arquivo pessoal.

Nesse experimento, tivemos grande problema com contaminações, que não sabíamos, de início, se era no ambiente ou nos meios formulados. Após uma limpeza e desinfecção da sala de PIV, foi feito um teste, colocando gotas de meios produzidos e um meio comercial na estufa, por 24 horas e, depois, avaliamos e confirmamos que a contaminação estava na manipulação dos meios no momento de sua confecção. Para isso, adotou-se mais cuidados higiênicos no momento da manipulação dos meios e realização de outro teste. Neste foi colocado uma gota de cada meio produzido e em separado uma gota de cada componente do meio. Além disso, foi colocado uma gota do meio produzido antes de aferir o pH. Incubadas todas essas gotas, a avaliação foi feita após 24 horas. O que se constatou foi que não havia contaminação nos componentes dos meios, mas, sim após o uso do pHmetro, pois o meio produzido, antes de passar no pHmetro, não apresentou contaminação. Dessa forma, foi trocado de aparelho.

Outras atividades puderam ser realizadas neste período. Dentre elas, destacam-se: limpeza da sala de PIV (sempre um dia antes da realização do preparo dos meios e antes do início das etapas da PIV), esterilização de materiais, aferição de CO₂, assistir apresentação de seminários realizados na turma do Curso de Zootecnia. Além disso, ocorreu discussão de artigo em língua inglesa e apresentação de seminário de artigos científicos no laboratório (Figura 6).



Figura 6: Apresentação de seminário. Fonte: Arquivo pessoal.

1.2 Laboratório de Andrologia do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE (ANDROLAB)

O ANDROLAB está localizado nas instalações do Departamento de Medicina Veterinária, pertencente à Universidade Federal Rural de Pernambuco, na sede em Recife.

Onde as atividades realizadas durante o período de 23 de maio a 19 de junho fizeram parte da segunda etapa deste estágio.

Este é composto por uma única sala, onde são realizadas as atividades de experimentos com sêmen, principalmente, de ovinos e caprinos. Os ovinos utilizados pertencem ao laboratório e os caprinos são do departamento de zootécnica, mas quando há necessidade são realizadas coletas de material em propriedades rurais nas proximidades.

Encontra-se no ANDROLAB equipamentos como: microscópio de fluorescência, microscópio de contraste de fase, sistema Análise Computadorizada de Sêmen Animal (CASA), vortex, centrífuga, banhos-maria, máquinas de congelamento de sêmen, ultrassom, citômetro de fluxo, destilador de água, osmômetro, dentre outros (Figura 7 e 8).



Figura 7: Instalações do Laboratório de Andrologia - DMV/UFRPE. Bancada com microscópios, máquina de congelamento de sêmen, pHmêtro, osmômetro, vortex (A); Bancada composta com armários, sobre esta encontra-se balança de precisão, banhos-maria, conjunto de pipetas(B). Fonte: Arquivo pessoal.

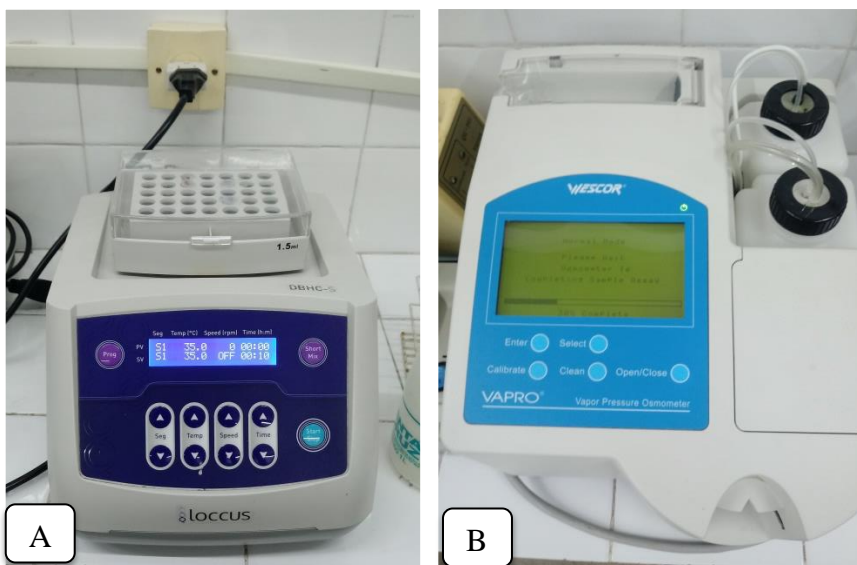


Figura 8: Equipamentos do laboratório. Banho-maria (A); Osmômetro (B). Fonte: Arquivo pessoal.

1.2.1 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO ANDROLAB

As atividades realizadas no ANDROLAB foram referentes aos experimentos dos alunos de pós-graduação que estão em andamento e, para melhor organização essas atividades estão demonstradas na Tabela 2. A equipe do ANDROLAB é conduzida pela Professora Doutora Maria Madalena Pessoa Guerra e pelo Professor Doutor André Mariano Batista, os mestrandos Joana Amélia, Guilherme e os doutorandos Robespierre Augusto, Flávio Mergulhão e Millena Maria.

Tabela 2: Atividades desenvolvidas e/ou acompanhadas, no ANDROLAB, no período de 23 de maio a 19 de junho de 2018.

ATIVIDADES	Frequência	
	Ovinos	Caprinos
Coleta de sêmen	6	3
Avaliação de motilidade e vigor	6	3
Avaliação da morfologia do sêmen	2	1
Avaliação usando o CASA	4	3
Avaliação da Integridade de membrana com fluorescência	2	1
Avaliação de potencial de membrana mitocondrial	2	1
Coloração com panótico	2	0
Refrigeração de sêmen	2	3
Congelamento de sêmen	0	3
Preparação de meio diluente para sêmen	2	2
Total	28	20

Para o experimento de Robespierre (doutorado) era necessário realizar coleta de sêmen dos caprinos e ovinos (Figura 9) em dias determinados, ambas as coletas com uso de vagina artificial. E, posteriormente era realizado a refrigeração e o congelamento do sêmen para avaliação do diluente que o mesmo havia preparado, anteriormente.



Figura 9: Coleta de sêmen. Contenção e coleta de sêmen caprino (A) e ovino (B). Fonte: Arquivo pessoal.

Para realizar o congelamento e/ou resfriamento do sêmen dos animais era necessário realizar a avaliação dos parâmetros de motilidade e vigor, como também concentração espermática, para isso, usou-se a Análise Computadorizada do sêmen Animal (CASA) e Câmara de Neubauer, respectivamente (Figura 10).

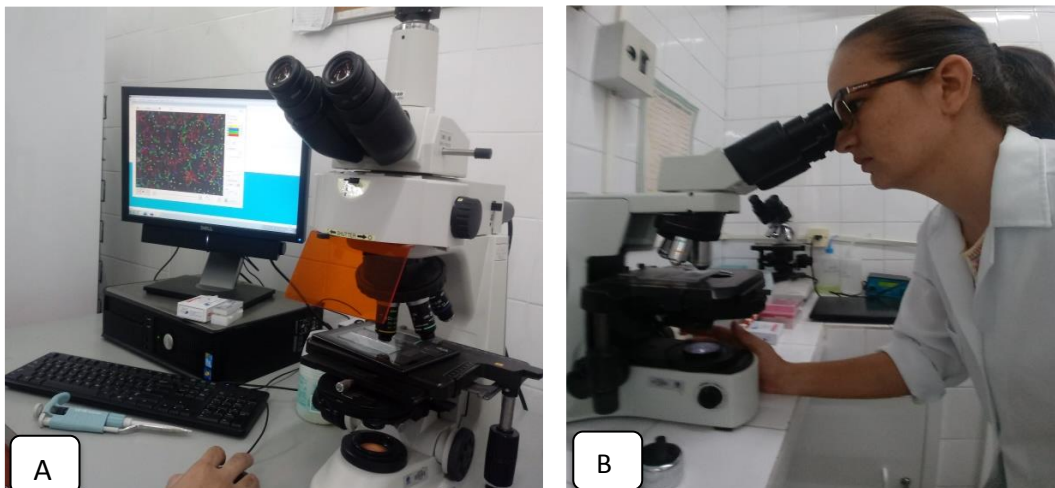


Figura 10: Avaliação de sêmen. Avaliação espermática no CASA (A); Contagem espermática em câmara de Neubauer (B). Fonte: Arquivo pessoal.

Após congelamento das amostras, algumas palhetas eram descongeladas para avaliações e, dentre essas se analisava a integridade da membrana plasmática e potencial da membrana mitocondrial (Figura 11).

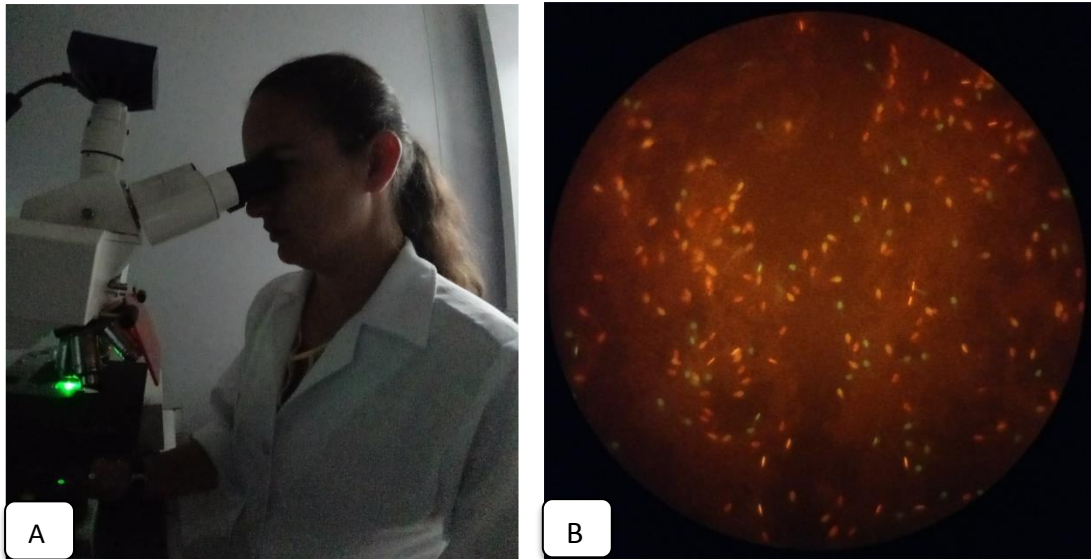


Figura 11: Avaliação espermática com fluorescência. Avaliação espermática em microscópio de fluorescência (A); imagem visualizada com microscópio de fluorescência (B). Fonte: Arquivo pessoal.

Dentre outras atividades, foi possível acompanhar saídas á campo para propriedades rurais com criação de ovinos, sendo realizados procedimentos como, por exemplo, uso de ultrassonografia no diagnóstico de prenhez (Figura 12), pesagem dos animais em confinamento para mensurar ganho de peso.



Figura 12: Diagnóstico de prenhez com uso de ultrassonografia. Fonte: Arquivo pessoal.

CAPÍTULO II - PESQUISA CIENTÍFICA

EFEITO DO EXTRATO DE *Abarema cochliacarpus* NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN OVINO

1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura é um setor agropecuário que no Nordeste brasileiro vem despontando e se apresenta com um forte potencial de crescimento. No entanto, é imprescindível dar atenção para o aprimoramento de biotecnologias da reprodução, visando melhorar os índices produtivos deste setor (NUNES, 2010).

Para tal, o uso de biotécnicas da reprodução, tais como, a inseminação artificial (IA) associada à criopreservação de sêmen é considerada fundamental em qualquer manejo visando o melhoramento genético do rebanho (COSTA, 2015). A IA é considerada uma técnica pioneira quando se reporta a melhoramento genético, pois se trata de uma das biotécnicas da reprodução mais antigas e, indiscutivelmente, a que provocou o maior ganho genético em decorrência da facilidade de seu domínio prático se tornou a mais expandida. Mas para o seu uso com eficiência faz-se necessário à difusão desta biotécnica entre os produtores, associada com um manejo tecnificado nos sistemas de produção e um programa de melhoramento genético voltado para atender os anseios dos produtores, visando o aumento da produção com qualidade e de forma eficaz (NUNES, 2010).

Na IA podem ser usado sêmen fresco, resfriado ou criopreservado (congelado/descongelado), de animais testados. No entanto, o sêmen criopreservado apresenta com principal vantagem a característica de conservação do germoplasma masculino por tempo indeterminado e, com capacidade fecundante (CAVALCANTE, 2008). Porém, apresenta como uma das desvantagens o fato do sêmen sofrer com as crioinjúrias alterando a qualidade seminal (BARROS et al., 2016).

O uso de diluentes é necessário, pois além de aumentar o volume do ejaculado, possibilita seu fracionamento em várias doses inseminantes, otimizando-se dessa forma seu uso. Sua função é proporcionar aos espermatozóides um meio que permita sua sobrevivência *in vitro* (CAVALCANTE, 2008).

Para tanto o uso de diluentes também visa diminuir as alterações sofridas pelas células espermáticas durante o processo de criopreservação, que se deve a mudanças na temperatura, injúrias oxidativas, formação de cristais de gelo, lesões no DNA, alterações na membrana da

célula espermática, estresse osmótico, dentre outras. Essas alterações levam a modificações estruturais e físico-químicas do espermatozóide, que ocasionam a diminuição de parâmetros como motilidade, viabilidade e fertilidade (SOARES; GUERRA, 2009; GUERRA et al., 2009).

Diante disso, diversos estudos vêm sendo realizados buscando amenizar os efeitos oxidativos causados à célula espermática. Para tanto, o uso de antioxidantes torna-se fundamental, pois sua função é inibir e minimizar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), para que estas não comprometam a viabilidade espermática dentre outros parâmetros (MAIA, 2006). Estes estudos visam além de identificar, quantificar a concentração adequada dos antioxidantes a serem usados de acordo com a espécie, possibilitando dessa forma, a diminuição do estresse oxidativo e a obtenção de um diluente eficiente (COSTA, 2015). Recentemente, pesquisas vêm apontando para o uso de extratos vegetais como uma alternativa viável com ação antioxidante. No entanto, ainda os resultados são controversos e mais pesquisas devem ser realizadas a respeito. Dentre as plantas com potencial antioxidante destaca-se a *Abarema cochliacarpus* (LINS-NETO et al., 2016). Portanto, o objetivo deste trabalho foi testar o efeito do extrato da *Abarema cochliacarpus* na criopreservação do sêmen ovino.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sêmen

Segundo Hafez e Hafez (2004), o sêmen é um composto líquido contendo espermatozóides e secreções (plasma seminal) das glândulas acessórias (vesiculares, bulbo uretrais e próstata), do testículo, do ducto deferente e do epidídimo. O plasma seminal é um composto fundamental na monta natural, pois serve como carreador e protetor dos espermatozóides. Esse composto é constituído por diversas proteínas, hormônios, açúcares, enzimas, dentre outros componentes (VIEIRA-NETO, 2017).

2.1.1 Espermatozóide e membrana plasmática

A partir da espermatogênese ocorre produção de espermatozóides, que são células constituídas de microtúbulos condensados, fibras e estruturas membranosas, e cada estrutura responde de uma forma quando submetidas ao choque térmico, durante o processo de criopreservação (COSTA, 2015).

Os espermatozóides são formados nos túbulos seminíferos dos testículos, a partir do desenvolvimento de uma série complexa de células germinativas. Quando completamente

desenvolvidas, essas células tem forma alongada e são formadas por cabeça e cauda (ou flagelo), sendo a cauda subdividida em colo e nas peças intermediárias, principal e terminal (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Toda a célula espermática é recoberta pela membrana plasmática, a qual difere de acordo com a região, e é constituída por fosfolipídios. Esta tem sua permeabilidade alterada quando submetida ao choque térmico, devido ao estabelecimento de canais através de suas extremidades hidrofóbicas externas e hidrofílicas internas permitindo a passagem de íons e pequenas moléculas, dessa forma, ocorrem danos irreparáveis a membrana e perda de viabilidade da célula (COSTA, 2015).

2.1.2 Capacitação espermática e reação acrossômica

Os espermatozóides são maturados na cauda do epidídimo e podem movimentar-se livremente, embora ainda não possuam capacidade fecundante. Estes só irão ser capazes de fecundar quando passarem por um processo denominado de capacitação espermática. Em ruminantes, esta se inicia na passagem pelo trato reprodutor feminino. Após a ejaculação, estes entram em contato com as BSP (proteínas do plasma) que recobrem essas células fazendo com que haja interação com as lipoproteínas de alta densidade (HDL) ocasionando o processo de capacitação espermática (COSTA, 2015).

Quando submetida à condição aeróbica, as células espermáticas produzem radicais livres, provenientes das reações metabólicas ocorridas fisiologicamente. Dentre os radicais livres tem-se o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO_3), que em baixas concentrações atuam induzindo a hiperativação, capacitação espermática e a reação acrossômica. Estes, fisiologicamente, são essenciais para a função espermática, especialmente na fosforilação da tirosina que atua essencialmente na capacitação espermática, dentre outras funções (COSTA, 2015).

2.2 Conservação seminal

2.2.1 Refrigeração

A técnica de resfriamento do sêmen consiste em submeter os espermatozóides em meio diluído a temperatura de cinco graus Celsius ($5^\circ C$). Para realizar essa queda de temperatura diferentes equipamentos podem ser utilizados dentre eles: refrigerador (geladeira), garrafas térmicas ou caixas isotérmicas com gelo e máquinas automatizadas. Diante disso, também diferentes técnicas podem ser usadas para realizar o resfriamento de sêmen. A utilização de geladeiras convencionais na refrigeração de sêmen se procede da seguinte forma: após diluição do sêmen e envase, as palhetas devem ser colocadas em frascos contendo água (em temperatura de $30^\circ C$) e devem ser levadas à geladeira, onde deveram

permanecer até estabilização da temperatura. Quando se usa caixas isotérmicas com gelo ou água gelada, deve-se evitar o contato direto das palhetas com o gelo, para isso geralmente se usa algodão envolvendo as palhetas (CORANDIN, 2011), no entanto, Lima et al. (2010) constatou que ao usar bolsas de água, visando evitar o choque térmico, em refrigerador convencional e em balcão refrigerador horizontal na refrigeração de sêmen ovino, foram eficientes no controle da queda de temperatura.

A refrigeração tem como vantagem a maximização do uso de reprodutores de diferentes espécies em virtude do aumento da longevidade espermática, além da praticidade no processamento do sêmen. Porém, na refrigeração de sêmen ovino a qualidade espermática se mantém até 24 horas semelhante ao sêmen fresco, no entanto, quando avaliado em 48 horas após refrigeração tem redução da motilidade total, apesar de não haver redução nos parâmetros de vigor e morfologia espermática, resultados estes observados em diferentes métodos de refrigeração de sêmen ovino (BERGSTEIN-GALAN et al., 2016).

Já quando o processo de refrigeração é realizado utilizando máquinas automatizadas controla-se a curva de tempo e temperatura. Para ovinos, na máquina TK3000® (TK Tecnologia em Congelação LTDA, Uberaba, Brasil), por exemplo, tens as curvas P3:S1 e P3:S2. A programação da curva P3:S1 consistia em resfriar o sêmen a 0,25°C/min até 5°C, mantê-lo nessa temperatura até completar 120 min e submetê-lo à congelação a 20°C/min até atingir 120°C. A programação da curva P3:S2 consistia em resfriar o sêmen a 0,5°C/min até 5°, mantê-lo nessa temperatura até completar 90 min e submetê-lo à congelação em duas fases: 15°C/min e 10°C/min até atingir -120°C (AZEVEDO et al., 2005).

De acordo com Azevedo et al. (2005) o sistema de refrigeração automatizado é bastante eficiente, quando estes compararam as curvas de resfriamento de sêmen ovino (P3:S1 e P3:S2) disponíveis no aparelho TK3000® não houve diferenças significativas entre as mesmas, ressaltando assim, que o uso de qualquer uma das duas curvas de refrigeração é indiferente.

2.2.2 Criopreservação do sêmen

A criopreservação surgiu como uma técnica que trouxe a possibilidade de armazenar o sêmen de reprodutores de alto valor genético e a facilidade de transportá-lo por longas distâncias, dessa forma, difundindo material genético de qualidade entre diferentes rebanhos (CASTELO et al. 2008), ou até mesmo raças diferentes, ocorrendo assim cruzamento entre

raças, como por exemplo de uma raça de maior produção (carne ou leite) com uma outra mais adaptada a determinada região (BITTENCOURT et al., 2013).

A criopreservação apesar de ser uma técnica bastante utilizada apresenta desvantagens uma vez que o processo de congelação/descongelação danifica cerca de 50% das células espermáticas. O sêmen ovino apresenta alta sensibilidade a esse processo, em função do estresse oxidativo sofrido pelos espermatozóides durante a criopreservação, gerando uma condição com baixa quantidade de antioxidantes e uma alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados na membrana, levando dessa forma a elevadas quantidades de espécies reativas de oxigênio (ERO), que afetam diretamente a qualidade espermática (SOUZA et al., 2016). Vale ressaltar, que os baixos índices de fertilidade com sêmen ovino congelado pode ser atribuído a dois fatores: as alterações estruturais, físico-químicas e funcionais sofridas pelos espermatozóides durante o processo, e outro fator é inerente as características anatômica apresentada pelo trato reprodutivo da fêmea (CAVALCANTE, 2008; BITTENCOURT et al., 2013).

Os danos causados aos espermatozóides não estão relacionados com a permanência destes a temperatura de -196°C , já que nessa temperatura não ocorrem reações bioquímicas. Mas estes danos podem estar ligados aos processos de resfriamento, congelação e descongelação (BITTENCOURT et al., 2013). Vale ressaltar que a ocorrência destes danos difere entre espécies, devido à variação de tamanho e forma dos espermatozoides, bem como sua composição lipídica. As alterações causadas por esse processo se deve a mudança na temperatura, injúrias oxidativas, formação de cristais de gelo, lesões no DNA, alterações na membrana do espermatozóide, estresse osmótico, além da toxicidade dos crioprotetores (SOARES; GUERRA, 2009).

2.3 Espécies reativas de oxigênio (ERO)

Fisiologicamente, as espécies reativas de oxigênio são encontradas em todos os sistemas biológicos. Sendo consistidas de diversas moléculas e radicais livres, portanto, sendo quimicamente metabólitos reativos de oxigênio altamente energéticos e instáveis por apresentarem número ímpar de elétrons. As ERO estão presentes no metabolismo celular normal e exercem papel fisiológico sobre a célula, porém em excesso podem ocasionar efeitos deletérios à célula (ALVAREZ; TOUCHSTONE; BLASCO, 1987; ARRUDA, 2014).

Estas são formada a partir da redução tetravalente do oxigênio (O_2), com aquisição de quatro elétrons, formando à água (H_2O), no decorrer desse processo são formados radicais

reativos como o superóxido (O_2^-), hidroperóxido (HO_2) e hidroxila (OH), além do não radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são responsáveis por causarem as maiores implicações na reprodução e, conseqüentemente, na fertilidade (SILVA E., 2010; SILVA S., 2010). Dentre os efeitos prejudiciais podem ocorrer o comprometimento do metabolismo energético dos espermatozoides (COSTA, 2015) e, além disso, em decorrência do excesso de ERO pode ocasionar o processo de peroxidação lipídica sendo esta responsabilizada pela redução na viabilidade e motilidade espermática, ocorrendo também comprometimento do acrossoma e do potencial de membrana mitocondrial (ARRUDA, 2014).

2.4 Peroxidação lipídica (LPO)

A peroxidação lipídica (LPO) ou lipoperoxidação é definida como a deterioração oxidativa de lipídios poli-insaturados que são considerados alvos ideais para os radicais livres. Em suma, a LPO consiste na incorporação de oxigênio molecular a um ácido graxo poli-insaturado, este processo pode ocorrer em diversas etapas e a partir disso podem ocorrer diversas possibilidades de reações químicas, dificultando assim sua compreensão (AITKEN, 1995; ARRUDA, 2014).

Devido a grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados, presente na membrana espermática, esta se torna mais suscetível à ocorrência de peroxidação lipídica que é apontada como uma importante causa de disfunção espermática. Isso ocorre porque a alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados determina a fluidez da membrana, que influencia diretamente na fertilidade, por provocar redução na velocidade e na porcentagem de espermatozoides móveis, diante disso, é notável a relação da LPO do sêmen com a morfologia e motilidade espermática, o que pode ser revertido ou controlado pela ação de antioxidantes, que podem ser adicionados aos meios diluentes durante o processamento do sêmen, com finalidade de manter o equilíbrio entre os agentes oxidantes e antioxidantes (MAIA, 2006; ARRUDA, 2014).

2.5 Diluentes

Os diluentes são substâncias que permitem a diluição do ejaculado, conseqüentemente, aumentando-se o volume e contribuindo para a divisão do ejaculado em várias doses inseminantes, além disso, permite a sobrevivência dos espermatozoides *in vitro*. De modo geral, algumas características configuram um bom diluente, como: apresentar componentes que protejam os espermatozoides das mudanças de temperatura, combinação adequada de nutrientes e minerais, pressão osmótica adequada para a espécie, que proporcione eliminação

ou neutralize os metabólitos nocivos decorrentes do metabolismo espermático e assegure a integridade da membrana plasmática dos espermatozóides (SILVA S., 2010).

Na reprodução de ovinos, a composição do diluente para a criopreservação é um desafio, pois o incremento de diferentes substâncias interfere na proporção de espermatozóides vivos e viáveis após descongelação. No entanto, independe de qual seja a espécie o diluente deve conter: um crioprotetor externo, uma fonte de energia, uma solução tampão, um crioprotetor interno e antibióticos (CAVALCANTE, 2008). Várias formulações de diluentes para congelação de sêmen ovino estão sendo avaliadas e utilizadas, as mais comuns são à base de glicina-gema, glicina-gema-leite, água de coco em pó (ACP-102®), citrato-açúcar-gema, leite ou leite desnatado, TRIS (tris-(hidroximetil) aminometano), meios contendo sacarose, lactose e/ou rafinose (CAVALCANTE, 2008; BITTENCOURT et. al, 2013).

2.5.1 Água de coco em pó (ACP-102®)

A água de coco (*Cocos nucifera L.*) apresenta-se como uma solução composta naturalmente ácida e estéril. Em sua composição apresenta sais, proteínas, vitaminas, carboidratos, gorduras neutras, baixa quantidade de fosfolipídios, osmolaridade semelhante ao do sêmen, pH adequado, ausência de toxicidade. Apresentando essa composição uma solução que se mostra com potencial para manter a sobrevivência e viabilidade espermática não apenas de sêmen ovino, como das demais espécies (NUNES, 1998; BRITO, 2017).

Dentre as vantagens apresentadas pelo diluente à base de água de coco estão o baixo custo, a facilidade no preparo e a matéria-prima abundante no Nordeste brasileiro. Porém, tem desvantagens como a conservação não pode ocorrer por muito tempo após colheita do fruto, variações na composição da solução entre diferentes frutos e sua colheita deve ser em período específico, o fruto deve estar com quatro a seis meses de maturação. Entretanto, essas desvantagens estimularam a padronização e confecção da água de coco em pó (ACP) obtida em sistema de desidratação a alto vácuo. O produto ACP tornou-se uma patente brasileira (ACP Serviços Tecnológicos, Ltda, ACP Biotecnologia, Fortaleza, Ceará, Brazil), dessa forma, este pode ser distribuído viabilizando seu uso em diferentes regiões e para diferentes espécies (NUNES, 1998; BITTENCOURT et. al, 2013).

Brito (2017) obteve resultado satisfatório quando usou o ACP-102 adicionado a 10% de óleo extra virgem na criopreservação de sêmen ovino, ressaltando que ocorreu a manutenção dos parâmetros avaliados com valores superiores aos recomendados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013), dentre esses parâmetros estão a atividade mitocondrial, integridade do DNA e a viabilidade espermática, além dos parâmetros cinéticos.

Outra característica ressaltada pelo autor, é que este meio de criopreservação é um diluente livre de produtos de origem animal configurando dessa forma como uma alternativa para os programas internacionais de inseminação artificial, viabilizando a exportação de doses de sêmen ovino congelados.

2.5.2 TRIS (tris-(hidroximetil) aminometano) e suas associações

De modo geral, o Tris é um dos meios bastantes utilizados na criopreservação de sêmen de diferentes espécies (WEISS et al., 2000), no entanto, sua utilização é de forma associada a aditivos sendo um dos principais a gema de ovo (MILCZEWSKI; KOZICKI; NEVES, 2000; SILVA E., 2010; SOUSA et al., 2010; SOUZA, MORAES, TONIOLLI, 2017). Sendo ainda usado Tris com Gema de ovo e citrato adicionado de frutose ou glucose que segundo Weiss et al. (2000), após usarem em sêmen canino obtiveram os maiores percentuais de motilidade progressiva com menores números de alterações de integridade de membrana pós-descongelamento. De acordo com Sousa et al. (2010) o Tris-Gema pode ser usado também na refrigeração de sêmen ovino obtendo resultados satisfatórios na conservação do sêmen à 4°C por até 48 horas, mantendo características de motilidade progressiva e vigor em níveis aceitáveis. No entanto, Monreal et al. (2014) obtiveram resultados inferiores no congelamento de sêmen ovino, quando avaliados os parâmetros de motilidade e vigor, comparando o uso do meio Tris ao meio à base de Glicina- Gema- Leite.

2.6 Crioprotetores

Crioprotetor é a referência dada a qualquer substância que confira proteção a célula durante a redução da temperatura evitando a formação de grandes cristais de gelo intracelular, além de atuar reduzindo o estresse osmótico, e mantendo um meio propício à sobrevivência espermática (SILVA; GUERRA, 2011). Estes podem ser classificados como penetrantes (intracelulares) ou não penetrantes (extracelulares), cada um com suas características específicas (SILVA S., 2010).

Os crioprotetores intracelulares se apresentam com componentes alcoólicos como o glicerol, o etilenoglicol e o dimetilsulfóxido (DMSO) e as amidas como a acetamina, lactamina e dimetilacetamina. Dentre os crioprotetores externos temos a gema de ovo e o leite desnatado (MILCZEWSKI; KOZICKI; NEVES, 2000).

2.6.1 Glicerol

O glicerol é um componente orgânico que se mantém líquido em temperatura ambiente, inodoro, higroscópico, adocicado, na forma comercial é usado o termo Glicerina.

Este provoca efeito osmótico e, além disso, age diretamente na membrana plasmática se ligando a porção lipídica da cabeça do espermatozoide, dessa forma, interagindo com as ligações proteicas e glicoproteicas da membrana além de interferir na fluidez da mesma (SILVA S., 2010). Por ser um crioprotetor penetrante sua ação protege a membrana plasmática de alterações estruturais geradas pelas altas concentrações de sais no meio durante a congelação, além disso, reduz a lesão mecânica ocasionada no momento da cristalização, pois este atua modificando a formação de cristais de gelo, por penetrar na célula espermática e substituir parcialmente a quantidade de eletrólitos e de água da célula (SALAMON; MAXWELL, 2000).

Depois de demonstrada a eficácia o glicerol este passou a ser usado constantemente para criopreservação de sêmen, e na espécie ovina é considerado o de eleição. A maioria dos estudos mostra que para sêmen criopreservado com diluidores hipertônicos as concentrações ideais de glicerol estão entre seis e oito por cento, apresentando maior penetrabilidade nos espermatozoides ovinos do que nos de bovinos, e para a criopreservação do sêmen de modo rápido, pelo método de “pellets”, obtêm-se melhores taxas de sobrevivência dos espermatozoides quando se utiliza concentrações de 3 a 4% de glicerol no diluidor (SALAMON; MAXWELL, 2000; BITTENCOURT et. al, 2013).

Apesar do uso frequente de glicerol na criopreservação de sêmen este apresenta efeito tóxico a célula espermática, segundo Alvarenga et al. (2005) a viabilidade e fertilidade pós descongelação são afetadas negativamente. Dentre os efeitos deletérios do glicerol aos espermatozoides estão o estresse osmótico, mudança na organização estrutural e fluidez da membrana plasmática, além de alterar a permeabilidade da membrana e desorganizar a composição lipídica (BITTENCOURT et. al, 2013). Devido aos efeitos negativos vários estudos procuram alternativas para seu uso ou substituição. Uma das formas encontradas foi realizar a diluição do sêmen em duas etapas, e realizar a adição do glicerol somente após o resfriamento à 5°C, porém nos dias atuais com processamentos automatizados é impossível parar o processo para adição do glicerol nesse período pós-refrigeração (SILVA S., 2010; BITTENCOURT et. al, 2013). Outros crioprotetores utilizados são o etilenoglicol, o propanodiol e o dimetil sulfóxido (DMSO), que agem protegendo a célula espermática, supostamente, com mesmo mecanismo de ação que o glicerol e apresentam menores pesos moleculares quando comparado ao glicerol (BITTENCOURT et. al, 2013).

2.7 Métodos de avaliação do sêmen

A análise do sêmen nas mais variadas espécies é uma ferramenta importante para assegurar a fertilidade de reprodutores, da mesma forma que possibilita a identificação e condenação de sêmen de má qualidade, considerados inviáveis para uso em biotécnicas, como a inseminação artificial. De modo geral, a avaliação da fertilidade de reprodutores era realizada de maneira subjetiva com bases descritivas, levando em consideração apenas a quantidade de espermatozoides e sua motilidade e morfologia. Porém, pesquisas mais recente mostram que a avaliação apenas destes parâmetros não é garantia de fertilidade do ejaculado (COSTA, 2015). Entretanto, vários pesquisadores vêm desenvolvendo testes laboratoriais que visam assegurar maior precisão nessa avaliação, mas sabe-se que nenhum teste laboratorial isolado é suficientemente capaz de inferir a respeito da qualidade seminal de um ejaculado (BATISTA; GUERRA, 2010).

As convencionais análises espermáticas realizadas por microscopia de luz estão sendo complementadas por avaliações em sistemas computadorizados. Atualmente, vários sistemas de análise computadorizada das células espermáticas (CASA) comerciais, como Hamilton Thorn (Hamilton Thorn Research, Bervely, USA); IMAGESP® (Vimas IMAGESP®, Barcelona, Espanha); Hobson Sperm Tracker (Hobson Tracking Systems Ltda., Sheffield, Inglaterra) e Sperm Class Analyzer® (Microptic SL, Barcelona, Espanha), baseados predominantemente na avaliação individual do espermatozoide vêm sendo utilizados para avaliações nas mais diversas espécies (BATISTA; GUERRA, 2010).

Outras avaliações são realizadas através de sondas fluorescentes, essa tecnologia de coloração para enzimas intracitoplasmáticas, lecitinas ou potencial de membrana dá suporte complementar para avaliação da integridade de alguns componentes celulares (SILVA; GADELLA, 2006).

2.7.1 Sistema Computadorizado de Avaliação Espermática (CASA)

Esse sistema automatizado auxilia e facilita a avaliação espermática através da visualização e digitação de imagens sucessivas dos espermatozoides, fornecendo informações precisas sobre a cinética dessas células. Também, fornece valores de diversos parâmetros analisados que definem o exato movimento de cada célula espermática (MONTEIRO, 2017).

Os parâmetros analisados pelo CASA são: Motilidade total (%): sendo a proporção de células móveis do total; Motilidade Progressiva (%): porcentagem de células com movimento progressivo; Velocidade curvilínea (VCL- $\mu\text{m/s}$): velocidade da trajetória real do espermatozoide; Velocidade linear progressiva (VSL- $\mu\text{m/s}$): velocidade média em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozoide; Velocidade média da trajetória (VAP- $\mu\text{m/s}$): velocidade da trajetória média ininterrupta do

espermatozoide; Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH - μm): amplitude do deslocamento médio da cabeça do espermatozoide em sua trajetória real; Frequência de batimento flagelar cruzado (BCF- Hz): número de vezes que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento, move-se para trás e para frente durante o trajeto percorrido; Retilinearidade (STR - %): valor médio entre VSL e VAP; Linearidade (LIN - %): valor médio da proporção entre VSL e VCL, Wobble ou índice de oscilação (WOB, %) (VERSTEGEN et al., 2002).

2.7.2 Integridade de membrana plasmática (IMP)

Para avaliação da integridade da membrana plasmática das células espermáticas diferentes métodos foram desenvolvidos visando determinar o estado funcional das mesmas. Para tanto, são utilizados sondas fluorescentes ou fluoróforos que apresentam como função se ligar a pontos específicos das células, levando a um diagnóstico rápido e direto (RODRIGUÉZ-MARTINÉZ, 2007; ARRUDA, 2018).

Dentre as sondas usadas com tais finalidades as que apresentam afinidade por DNA são as mais utilizadas. Em revisão de Silva e Gadella (2006) citaram uso das seguintes sondas: Hoechst 33258, Iodeto de Propídeo (IP). Utilizando-se sondas anfipáticas também se consegue avaliar a integridade da membrana, dentre elas temos o Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF) (ARRUDA, 2018).

2.7.3 Potencial de membrana mitocondrial (PMM)

Em revisão de Batista e Guerra (2010) citaram que a avaliação da função mitocondrial espermática algumas sondas fluorescentes têm sido utilizadas, estas sondas são ativamente transportadas nas mitocôndrias que possuem respiração ativa, então, quanto mais ativa essa respiração, mais corante é acumulado nas organelas.

Alguns dos fluoróforos utilizados para avaliar a função mitocondrial do espermatozoide são o Rodamina 123 (R123) e MitoTracker™ (MITO), no entanto, essas fluorescem em verde quando a membrana mitocondrial está funcional, não diferenciando a taxa de respiração ativa. Entretanto, quando se usa o JC-1 em baixas concentrações, permanece no seu estado monomérico e fluoresce em verde. Porém, em elevadas concentrações, o JC-1 forma agregados que fluorescem em laranja. Desta forma, este fluoróforo não apenas tem a habilidade para diferenciar a mitocôndria funcional daquela não funcional como, também, permite que os diferentes níveis de função mitocondrial sejam observados pela intensidade da cor laranja na mitocôndria (MOCÉ; GRAHAM, 2008; BATISTA; GUERRA, 2010; ARRUDA, 2018).

2.8 Uso de antioxidantes fitoterápicos na criopreservação de sêmen ovino

O termo antioxidante significa "substância que evita ou previne a oxidação, em especial os efeitos nocivos causados no organismo pelos radicais livres", segundo o Dicionário Aurélio (2018). A função dos antioxidantes é regenerar o substrato ou prevenir significativamente a oxidação do mesmo. Afinal, a célula possui sistema de defesa que funciona de duas maneiras uma prevenindo a lesão e a outra ajudando na recuperação da célula após a lesão. O sêmen ovino também possui enzimas antioxidantes, dentre elas estão a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e a catalase (CAT), mas com a diluição do sêmen a concentração dessas enzimas fica reduzida (GUERRA et al., 2012).

Em decorrência da conhecida ação das ERO sobre a célula espermática, faz-se necessária a identificação de antioxidantes que possam ser utilizados para equilibrar a ação dos oxidantes produzidos durante os procedimentos tanto de congelamento como de refrigeração (GUERRA et al., 2012).

Diante disso, vários estudos vêm sendo realizados em busca de uma composição de diluente mais eficaz visando o uso de antioxidantes alternativos, como por exemplo, extratos vegetais. Segundo Bozzi (2017) ao avaliar o uso de suco de diferentes frutas e beterraba em diferentes concentrações e combinações no diluente de criopreservação para sêmen de carneiros, constatou que o suco da beterraba a 10% adicionado ao meio comercial BotuBovi (Botufarma[®]), obteve os melhores resultados pós-descongelamento em relação a motilidade total e progressiva que os demais tratamentos, segundo o autor este pode ser considerado como uma opção na criopreservação de sêmen ovino.

A adição de antioxidantes à base de substratos de origem vegetal é uma alternativa bastante atrativa, particularmente quando se trata de produto fitoterápico proveniente de flora brasileira. Além disso, a utilização desses extratos possibilita um maior controle sanitário do produto utilizado. Com o passar dos anos e a evolução tecnológica, o conhecimento sobre as plantas evoluiu e ocasionou a possibilidade de isolamento dos princípios ativos presentes nestas fontes vegetais (BITTENCOURT et al., 2013).

Diante dessas informações observa-se que algumas plantas, naturalmente, apresentam características antioxidantes. Segundo Marsico (2016) constatou que apesar de apresentarem ação antioxidante em testes laboratoriais, essa ação não é, na maioria das vezes, efetiva na proteção espermática. Esse mesmo autor testou extratos vegetais de *Anacardium microcarpum* (Caju-do-campo), *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão), *Croton*

campestris (Velame-do-campo), *Duguetia furfuracea* (Ata-de-lobo) em concentração de 10mg/ml (1%), obtendo resultados insatisfatórios para ambos os extratos e enfatizou que mais testes devem ser realizados visando definir uma concentração adequada e para identificar quais extratos podem ter um papel determinante na prevenção dos danos de membrana dos espermatozoides.

Com enfoque em ovinos, Gil et al. (2010) obtiveram resultados satisfatórios ao utilizar meio diluente com a adição de extrato aquoso de folhas de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) de sêmen criopreservado, uma vez que houve aumento na motilidade espermática do grupo tratamento contendo 5g.L⁻¹. De acordo com Motlagh et al. (2014) usando o mesmo extrato nas concentrações de 2% e 4%, foi observado aumento nos valores percentuais de motilidade total e progressiva. O grupo tratado com 4% também apresentou melhorias junto ao grupo tratado com 6% de extrato de alecrim no diluente, pois apresentou melhor índice de funcionalidade da membrana plasmática espermática, maior percentual de espermatozoides vivos pós-descongelamento e menor peroxidação lipídica espermática.

Outra planta que deve ser estudada mais profundamente em relação a sua comprovada atividade antioxidante é a *Abarema cochliacarpus*, esta por sua vez é uma espécie nativa do Brasil, presente principalmente na Mata Atlântica, pertence à família *Leguminosae* - *Mimosiodae*. É uma árvore frondosa de pequeno a médio porte, possuindo inflorescência em glomérulos globosos, frutos do tipo legume contorcido, flores ligeiramente amareladas, folhas compostas e sementes brancas acinzentadas, amplamente utilizada *in natura* no Brasil como planta medicinal, e é considerada uma espécie vulnerável à extinção. Essa planta apresenta inúmeras propriedades medicinais, pois a partir de estudos fitoquímicos primários relataram a presença de saponinas, catequinas, taninos, fenóis e antraquinonas. Nas catequinas mostram evidências de atividade antioxidante e capacidade de combate aos radicais livres (LINS-NETO, 2015; TENORIO et al., 2016).

Segundo Lins-Neto (2015), as folhas de *A. cochliacarpus* apresentam relevante ação antioxidante naturais, que agem de maneira benéfica sobre o estresse oxidativo, esse resultados foram obtidos frente aos ensaios do DPPH (α -difetil- β -picril-hidrazila), ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)) e capacidade antioxidante total.

Portanto, diferentes substâncias (sintéticas ou não) estão sendo avaliadas e testadas com ação antioxidante na criopreservação de sêmen ovino, mas infelizmente ainda não foi possível estabelecer uma formulação ideal do meio diluente para essa espécie. Para tanto, deve-se atentar para essencialidade do uso de antioxidantes no meio diluidor, em decorrência

da extrema necessidade de proteção da célula, para que esta após o processamento de criopreservação seja capaz de realizar sua função, a fertilização. Para tanto, linhas de pesquisas estão buscando alternativas de antioxidantes de origem vegetal ou também chamados de fitoterápicos. Então, objetivo deste trabalho foi testar o efeito do extrato da *Abarema cochliacarpus* na criopreservação de sêmen ovino.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais, local e período do experimento

O presente trabalho de pesquisa foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal de Pernambuco (LABRAPE), localizado nas dependências da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG). Onde foram utilizados ovinos, oriundos de propriedades rurais no município de Garanhuns, na Mesorregião do Agreste Pernambucano, localizada a uma Latitude: 08° 53' 25" S e Longitude: 36° 29' 34" W. Distante cerca de 230 km da capital pernambucana, Recife. O experimento foi realizado no mês de janeiro de 2018, e teve aprovação do Comitê de Ética para Uso dos Animais (CEUA), licença número 127/2017.

3.2 Preparo do extrato

Para o preparo do extrato aquoso foram utilizadas 20 g de pó seco das folhas de *Abarema cochliacarpus* para 1000 ml de água destilada, em 5 etapas de preparação para obtenção do extrato aquoso estéril: 1) Vinte gramas (20 g) de matéria vegetal seca (pó) foram suspensos em 300 ml de água destilada a 100°C, permanecendo em infusão por 24h, devidamente fechado e protegido da luz; 2) Após este período, procedeu-se a filtração, e foram adicionados mais 350 ml de água destilada ao resíduo vegetal da filtração à temperatura de 100°C, sendo este mantido em infusão por mais 24h de forma semelhante à primeira fase; 3) A extração obtida nesta segunda fase foi filtrada e ao resíduo resultante da filtração, foram adicionados mais 350 ml de água destilada a 100°C e mantidos em infusão por mais 24h, concluindo o processo de extração; 4) Ao final da última filtração foram obtidos três extratos aquosos brutos que foram misturados resultando em um único extrato; 5) O extrato final foi submetido à filtração a vácuo, sendo que no momento da realização do experimento o volume de extrato que seria utilizado foi previamente submetido à filtração microbiológica com membrana Milipore® de 0,22 µm, e esta solução foi acondicionada em tubos estéreis de vidro, mantidos a 4°C e protegidos da luz.

3.3 Coleta do sêmen

Foram utilizados dois ovinos machos adultos, selecionados após exame andrológico. E que após serem condicionados a coletar com vagina artificial, passaram a ser coletados em

dias alternados dando descanso aos animais de 72 horas entre as coletas. Durante a coleta fazia-se uso de ovelhas como manequins não necessariamente em estro, a qual era contida manualmente. A recepção do sêmen foi em cone coletor de silicone e tubos Falcon[®] graduados.

3.4 Avaliação do sêmen fresco

À medida que o sêmen era coletado o mesmo era de imediato encaminhado ao Laboratório de Reprodução Animal de Pernambuco (LABRAPE) para realização do espermiograma, quantificando os seguintes parâmetros: volume (ml), concentração espermática ($\times 10^9$ espermatozoide/ml), motilidade progressiva (MP, 0-100%), e vigor (0-5), de acordo com os critérios preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Pipetava-se uma alíquota de 2,5 μ l de sêmen diluindo em 997,5 μ l de água ficando dessa forma numa concentração de 1:400, onde a partir dessa amostra foi realizado a contagem espermática, definindo a concentração espermática usando-se a câmara de Neubauer.

3.5 Adição do extrato ao sêmen

O sêmen foi diluído adicionando o meio diluente, já acrescido do extrato de *Abarema cochliacarpus*. O sêmen recebeu concentrações de extrato já preestabelecidas. O extrato obtido através da extração aquosa foi submetido a diversos testes quanto à atividade antioxidante (SILVA et al., 2009; BIANCHETTI, 2014) e posteriormente foi feito a análise juntamente com sêmen de carneiro onde foi utilizado as concentrações: C0 (controle); C2,5; C1,25; C0,67; C0,31; C0,2 miligramas do extrato .

3.6 Congelamento do sêmen

Após a diluição o sêmen foi envasado em palhetas de 0,25ml e submetido ao processo de congelamento, utilizando-se a máquina TK3000[®] (TK Tecnologia em congelamento LTDA, Uberaba, Brasil), utilizando-se uma curva rápida de congelamento (P3:S1) com um período de uma (01) hora de estabilização conforme estudos anteriores em nosso laboratório (CARNEIRO, 2008). Em seguida, foi iniciada a curva de congelamento (-20 °C/ min), até atingir -120 °C. Então, as palhetas foram imersas e estocadas em nitrogênio líquido (-196°C), até o momento das análises.

3.7 Avaliação pós-descongelamento do sêmen

Realizado o congelamento das amostras pretendidas realizou-se a avaliação dos parâmetros espermáticos após o descongelamento (37 °C por 30 segundos).

3.7.1 Computer assisted sperm analysis (CASA)

A análise da cinética espermática foi realizada utilizando o CASA. Uma alíquota (3 μ l) da amostra diluída foi colocada sobre lâmina e coberta com lamínula (18 x 18 mm), ambas

pré-aquecidas (37 °C), e avaliada em microscópio de contraste de fase (Eclipse 50i, Nikon, Japão, 100x). As imagens foram capturadas por uma câmera de vídeo (Basler Vision Technologies™ A312FC, Alemanha). Para cada amostra, cinco campos aleatórios foram selecionados, com registro de, no mínimo, 500 células espermáticas. As variáveis analisadas foram: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %); velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidade em linha reta (VSL, $\mu\text{m/s}$); velocidade média da trajetória (VAP, $\mu\text{m/s}$), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH, $\mu\text{m/s}$); frequência de batimento flagelar cruzado (BCF, Hz); índice de oscilação (WOB, %).

3.7.2 Integridade de membrana plasmática (IMP)

Os seguintes procedimentos foram realizados para análise de integridade da membrana plasmática (IMP). Aliquotas (40 μl) de sêmen de cada grupo experimental foram distribuídas em microtubos (1,5 ml), para cada uma das avaliações, aos quais foram adicionados 5 μl de Iodeto de Propídeo, 5 μl de CFDA (6 carboxifluoresceína) e 5 μl de paraformol. A seguir, foram colocados 5 μl de cada amostra sobre lâmina e coberta com lamínula (18 x 18 mm) e submetidas a avaliação em microscópio de fluorescência. Para cada amostra, cinco campos aleatórios foram selecionados, com registro de 200 células espermáticas, sendo classificadas como íntegras aquelas que apresentaram coloração verde e não íntegra aquelas coradas em vermelho.

3.7.3 Potencial de membrana mitocondrial (PMM)

Para análise do potencial de membrana mitocondrial (PMM), adicionou-se 5 μl de JC-1 às amostras de sêmen contendo 40 μl , distribuídas em microtubos de 1,5 ml. A seguir, as amostras foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente e avaliadas. Células com peças intermediárias coradas em laranja foram classificadas com portadoras de alto potencial de membrana mitocondrial. Para cada amostra, cinco campos aleatórios foram selecionados, com registro de 200 células espermáticas.

3.8 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), com seis tratamentos e seis repetições (3 por animal). Os tratamentos foram compostos das concentrações C0 (controle); C2,5; C1,25; C0,67; C0,31 e C0,2 mg do extrato. Os dados obtidos foram submetidos pós-transformação pelo arco seno ($\arcsen \sqrt{P/100}$) à análise de variância (ANOVA) pelo teste “F”, sendo as médias dos tratamentos comparados com o Teste Tukey à 5% de significância.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram usadas cinco concentrações diferentes do extrato nas amostras de sêmen, formando os seguintes tratamentos: 0mg (controle), 2,5 mg(C2,5), 1,25 mg (C1,25), 0,67 mg (C0,67), 0,31 mg (C0,31) e 0,2 mg (C0,2) do extrato. As amostras foram submetidas à avaliação no sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) obtendo-se os resultados demonstrados na Tabela 3, onde observou-se que não houve diferenças significativas entre as concentrações nos seguintes parâmetros: MT, VCL, VSL, VAP, WOB e ALH.

Tabela 3: Valores médios pós-descongelamento de sêmen ovino com adição do extrato vegetal, com avaliação no sistema computadorizado CASA.

Parâmetros avaliados	CONTROLE	C2,5	C1,25	C0,67	C0,31	C0,2
MT(%)	49,40 ^a	51,01 ^a	50,37 ^a	45,37 ^a	51,72 ^a	47,36 ^a
MP(%)	27,34 ^{a,b}	30,80 ^{a,b}	33,91 ^b	25,76 ^a	29,87 ^{a,b}	28,07 ^{a,b}
VCL(µm/s)	64,68 ^a	69,13 ^a	73,00 ^a	62,25 ^a	74,23 ^a	72,50 ^a
VSL(µm/s)	41,06 ^a	49,81 ^a	54,58 ^a	40,95 ^a	47,96 ^a	44,90 ^a
VAP(µm/s)	50,25 ^a	62,18 ^a	60,80 ^a	49,63 ^a	58,48 ^a	55,62 ^a
LIN(%)	52,82 ^{a,b}	53,56 ^{a,b}	59,01 ^b	54,15 ^{a,b}	53,13 ^{a,b}	51,92 ^a
STR(%)	64,75 ^a	64,12 ^a	70,69 ^b	65,25 ^{a,b}	64,61 ^a	64,05 ^a
WOB(%)	61,80 ^a	63,30 ^a	65,17 ^a	63,30 ^a	62,39 ^a	61,11 ^a
ALH(µm/s)	2,36 ^a	2,28 ^a	2,26 ^a	2,03 ^a	2,35 ^a	2,54 ^a
BCF(Hz)	10,48 ^{a,b}	10,08 ^a	11,50 ^b	9,36 ^a	10,33 ^{a,b}	10,46 ^{a,b}

MP= motilidade progressiva; MT= motilidade total; VCL= velocidade curvilínea; VSL= velocidade linear progressiva; VAP= velocidade média da trajetória; LIN= linearidade; STR= retilinearidade; ALH= amplitude de deslocamento lateral da cabeça; BCF= frequência de batimento flagelar cruzado;. Letras minúsculas entre tratamentos diferentes na mesma linha significam P<0,05.

No entanto, houve diferença significativa entre os tratamentos quando avaliados os parâmetros de motilidade progressiva (MP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR) e frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) e em ambos os parâmetros se destacou a concentração contendo 1,25mg de extrato de *Abarema cochliacarpus*, sendo que apenas o STR apresentou diferença em relação ao controle e os demais parâmetros citados não diferiram do controle. Porém, ficou demonstrado que concentrações menores que 1,25 mg do extrato apresentaram menores valores percentuais dos parâmetros avaliados no CASA, podendo levar a concluir que concentrações menores que esta podem não apresentar ação antioxidante esperada. Contudo, uma hipótese que pode explicar o fato de que valores superiores a este podem comprometer a qualidade espermática pós-descongelamento também não sendo indicado uso de concentrações mais altas deste extrato. Essa hipótese corrobora com trabalho de Marsico (2016), onde observou que diferentes extratos em diferentes concentrações podem apresentar comportamentos bioquímicos diferentes entre si.

Tabela 4: Valores médios da avaliação de Integridade de membrana plasmática (IMP) e Potencial de membrana mitocondrial (PMM) através de sondas fluorescentes.

	CONTROLE	C2,5	C1,25	C0,67	C0,31	C0,2
IMP	28,50 ^a	37,25 ^a	31,50 ^a	22,25 ^a	21,25 ^a	38,00 ^a
PMM	58,25 ^a	66,50 ^a	69,25 ^a	88,75 ^a	81,25 ^a	73,00 ^a

Letras minúsculas entre tratamentos diferentes na mesma linha significam $P < 0,05$.

Neste experimento, não foi observado diferenças significativa entre os tratamentos no que diz respeito ao comprometimento da integridade de membrana plasmática e do potencial de membrana mitocondrial. Corroborando com resultados encontrados por Santos (2014) que também fez uso de um extrato vegetal à base de própolis verde como antioxidante no resfriamento de sêmen equino e demonstrou que não houve comprometimento da funcionalidade mitocondrial e integridade de membrana plasmática, entretanto houve diminuição da motilidade espermática. Não há nenhuma evidência, a nosso conhecimento, sobre o efeito do extrato de *Abarema cochliacarpos* especialmente no padrão de atividade mitocondrial e estado apoptose em espermatozoides de mamíferos.

5. CONCLUSÃO

Conclui-se com esse trabalho, que é possível a utilização de antioxidante a base de extrato vegetal da *Abarema cochliacarpos* em sêmen ovino, visto que não houve comprometimento nos parâmetros de integridade de membrana e potencial mitocondrial. Observou-se ainda um efeito positivo na avaliação computadorizada de espermatozoide (CASA), visto que foi possível observar diferença entre os tratamentos nos parâmetros de motilidade progressiva (MP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR) e frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), havendo um destaque para a concentração de 1,25mg de *Abarema cochliacarpos*.

Conclui-se que os extratos fitoterápicos da *Abarema cochliacarpos* podem ser usados na criopreservação de sêmen ovino, no entanto maiores estudos serão necessários para indicar a concentração adequada que pode ser utilizada do extrato para que este desempenhe o papel antioxidante esperado.

Além disso, vale ressaltar que o presente estudo foi o pioneiro avaliando o efeito deste extrato sobre os parâmetros pós-descongelamento de espermatozoides ovinos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKEN, R. J. *Free radicals, lipid peroxidation and sperm function*. **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, p.659-668, 1995.
- ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. et al. *Amides a crioprotectants for freezing stallion semen. A review*. **Animal Reproduction Science**. V.89, p. 105-113, 2005.
- ALVAREZ, J. G.; TOUCHSTONE, J. C.; BLASCO, L. et al. *Spontaneous lipid peroxidation of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa Superoxide dismutase as major enzima protectant against oxygen toxicity*. **Journal of Andrology**, v.8, p.338-348, 1987.
- ANTIOXIDANTE. **Dicionário Aurélio** Online. Disponível em: www.dicionarioaurelio.com Acesso em: 20/05/2018.
- ARRUDA, L. C. P. **Peroxidação lipídica da membrana plasmática de espermatozoides caprinos e ovinos submetidos à criopreservação com Trolox**. 2014. Dissertação (Mestrado-Programa de pós-graduação em Ciência Animal Tropical), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife-PE.
- ARRUDA, L. C. P. **Uso de miricetina em meio de criopreservação de sêmen ovino**. 2018. Tese (Doutorado - Programa de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE.
- AZEVEDO, H. C. et al. Cinética e integridade dos espermatozoides no sêmen ovino submetido a diferentes ritmos de refrigeração e congelamento em sistema automatizado. **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, 16, 2005. Goiânia, GO.
- BARROS, F. N. et al. **Adição do ácido fólico na criopreservação de sêmen ovino da raça Santa Inês**. Congresso Norte-Nordeste de Reprodução Animal (VIII CONERA), 8, 2016, Teresina, PI. Anais...Belo Horizonte: CBRA, 2016.
- BATISTA, A. M.; GUERRA, M. M. P. Novas técnicas para avaliação da qualidade do sêmen caprino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.34, n.3, p.125-132, jul./set. 2010.
- BERGSTEIN-GALAN, T. G. et al. Comparação de três métodos de refrigeração do sêmen ovino pelo período de 24 e 48 horas. **Archives of Veterinary Science**. v.21, n.4, p.66-73, 2016.
- BIANCHETTI, P. **Avaliação da atividade antioxidante e antibacteriana de extratos aquosos e etanólicos de plantas da família Mytaceae frente ao micro-organismo Escherichia coli**. (Dissertação de mestrado). Lajeado: Mestrado em Biotecnologia - UNIVATES; 2014. p.47.
- BITTENCOURT, R. F. et al. Avanços na criopreservação do sêmen ovino I: diluidores e crioprotetores. **Cienc. anim. bras.**, Goiânia, v.14, n.4, p. 522-536, out./dez. 2013..
- BOZZI, A. R. **Adição de sucos de frutas e beterraba no diluente de sêmen criopreservado de ovino**. 2017. Dissertação (Mestrado - Programa de pós-graduação em Produção Animal Sustentável), Instituto de Zootecnia. APTA/SAA, Nova Odessa.
- BRITO, B. F. **Criopreservação de sêmen ovino em meio à base de água de coco em pó (ACP-102) adicionada de óleo de coco extra virgem**. 2017. Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza -CE.
- CARNEIRO, G.F. Biotécnicas da Reprodução Assistida em Pequenos Ruminantes. **Tecnologia & Ciencia Agropecuaria**, v.2, p.23-28, 2008.
- CASTELO, T. S.; FROTA, T. R.; SILVA, A. R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos ; **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, n.3, p.67-75, 2008.
- CAVALCANTE, J. M. M. **Avaliação do sêmen ovino diluído e congelado em meio à base água de coco em pó (ACP-102) ou Tris**. 2008. Dissertação (Programa pós-graduação

em Ciências Veterinárias) Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza -CE.

- CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3.ed. Belo Horizonte, 2013.
- CORANDIN, E. M. **Sêmen refrigerado e congelado pra inseminação artificial em ovinos**. 2011. Seminário (Mestrado- Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal), Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.
- COSTA, J. M. S. **Efeito da adição de antioxidantes no sêmen de carneiros sobre a qualidade espermática após descongelamento**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus de Ciências Agrárias, Petrolina-PE.
- GUERRA, M. M. P. et al. Aspectos críticos da congelação do sêmen caprino. **Rev Bras Reprod Anim Supl**, Belo Horizonte, n.6, p.42-49, dez. 2009.
- GUERRA, M. M. P. et al. Uso de antioxidante no sêmen ovino. **Ciência Animal**, 22(1); p.354-364, 2012.
- GIL, L. et al. *Freezing ram sêmen: The effect of combination of soya and rosemary essences as freezing extender on post-thaw sperm motility*. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, n.2, p.91, 2010.
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7ª Ed. São Paulo. Manole, 2004.
- LIMA, L. F. et al. Influência de sistemas de refrigeração sobre a qualidade do sêmen ovino criopreservado em palhetas. 2010. **Cien. Anim. Bras.**, Goiânia, v. 11, n. 4, p. 835-844.
- LINS-NETO, J. R. **Potencial antioxidante de plantas da flora Pernambucana**. 2015. Dissertação (programa de pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).
- MAIA, M. S. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos de oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio (OE), Trolox-C e catalase**. 2006. Tese (doutorado), Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu-SP.
- MARSICO, T. V. **Análise de estresse oxidativo em células espermáticas congeladas de bovinos com a adição dos antioxidantes naturais**. 2016. Trabalho de conclusão de curso (TCC III) apresentado ao curso de graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa – Campus SG/RS.
- MILCZEWSKI, V.; KOZICKI, L.E.; NEVES, J.P. Viabilidade do sêmen ovino refrigerado em diferentes diluentes. **Archives of Veterinary Science** v.5, p.29-33, 2000.
- MOCÉ, E.; GRAHAM, J. K. *In vitro evaluation of sperm quality*. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 104-118, 2008.
- MONREAL, A. C. D. et al. Glicina Gema Leite para criopreservação de sêmen de carneiros sem raça definida. **Revista Agrarian**. Dourados, v.7, n.23, p.124-131, 2014.
- MONTEIRO, M. M. Efeito da melatonina sobre a qualidade do sêmen congelado de caprino. 2017. Dissertação (Mestrado- Programa de pós-graduação em Ciência Animal Tropical), Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife-PE.
- MOTLAGH, M.K. et al. *Antioxidant effect of rosemary (Rosmarinus officinalis L) extract in soybean lecithin-based semen extender following freeze-thawing process of ram sperm*. **Cryobiology**, v.69, p.217-222, 2014.
- NUNES, J.F. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de animais domésticos e do homem. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.22, n.2, p.109-112, 1998.
- NUNES, J. F.; **Biotécnicas reprodutivas aplicadas a pequenos ruminantes** / Fortaleza: Tecnograf, 2010.
- RODRIGUÉS-MARTINÉZ, H. *State of the art in farm animal sperm evaluation*. **Reprod Fertil Dev**, v.19, p.91-101, 2007.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. *Storage of ram semen*. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.77-111, 2000.

- SANTOS, F. C.C. **Utilização de extrato de própolis verde no resfriamento de sêmen equino.** 2014. Dissertação (Programa de pós-graduação em Veterinária), Universidade Federal de Pelotas
- SILVA, E. C. B. **Efeito da adição de diferentes crioprotetores e antioxidantes na criopreservação de sêmen ovino da raça Santa Inês.** 2010. Dissertação (Mestrado-Programa de pós-graduação em Ciência Veterinária), Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife-PE.
- SILVA, N. C. B. et al. Antinociceptive Effects of *Abarema cochliacarpos* (B.A. Gomes) Barneby & J.W. Grimes (Mimosaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.** 19(1): 46-50, 2009.
- SILVA, P. N. F.; GADELLA, B. M. *Detection of damage mammalian sperm cells.* **Theriogenology.** v. 65, p.958-978, 2006.
- SILVA, S. V. **Avaliação de espermatozoides ovinos criopreservados em Tris-gema acrescidos de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos.** 2010. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária), Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Medicina Veterinária. Recife-PE.
- SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Rev. Bras. Reprod. Anim.,** Belo Horizonte, v.35, n.4, p.370-384, out./dez. 2011.
- SOARES, A. T.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática. **Tecnol. & Ciên. Agropec.,** João Pessoa, v.3, n.2, p.53-63, jun. 2009.
- SOUSA, B. P. A. et al. Viabilidade in vitro de células espermáticas ovinas submetidas a diferentes diluentes e a refrigeração. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.,** v.62, n.3, p.528-535, 2010.
- SOUZA, W. L. et al. Efeito de diferentes concentrações de melatonina em espermatozoides de carneiros sobre estresse oxidativo após criopreservação. **Pesq. Vet. Bras.** p.657-664, julho 2016.
- SOUZA, W. L.; MORAES, E. A.; TONIOLLI, R. Adição de antioxidantes ao sêmen de carneiros e seus efeitos após a descongelação. **Pesq. Vet. Bras.** 37(5):471-478, maio/2017.
- TENÓRIO, R. F. L. et al. Atividade antibacteriana in vitro do extrato de *Abarema cochliacarpos* (GOMES) barneby & j.w. Grimes contra bactérias isoladas de feridas cutâneas de cães / **Cienc. anim. bras.,** Goiânia, v.17, n.2, p. 252-259 abr./jun. 2016.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. *Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice.* **Theriogenology,** v. 57, p. 149-179, 2002.
- VIEIRA-NETO, M. F. **Efeito da flunixin meglumina na atividade espermática de machos ovinos e caprinos.** 2017. Dissertação (Mestrado - Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza-CE.
- WEISS, R. R. et al. Estudo preliminar de algumas características do sêmen canino congelado. **Archives of Veterinary Science** v.5, p.67-71, 2000.

ANEXO

LICENÇA CONDICIONAL DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE



CEUA - UFRPE
Aprovado em
06/02/2017
Validade
06/02/2018

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – F07
Licença condicional para o uso de animais em experimentação e/ou ensino

A Comissão de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	127/2017
Número do processo	23082.008932/2017-90
Data de emissão da licença	06 de dezembro 2017.
Título do Projeto	Efeito do antioxidante no congelamento de sêmen caprino e ovino.
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa.
Responsável pela execução do projeto	Gustavo Ferrer Carneiro.
Colaboradores	Breno Barros de Santana; Maria Clecia Machado Costa; José Adelson Alves do Nascimento Júnior; Amanda Régis Guedes.
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Animal: Ovino :02.. Machos = 02 Total: 02.

Profª Drª Marleyne Amorim
Presidente CEUA/UFRPE
SIAPE 384977

Profª. Dra. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim
(Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA /UFRPE)