

DESIRÉE COELHO DE MELLO SEAL

EFEITOS DA ADIÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DA FOLHA DE *Moringa Oleífera Lam.* AO DILUIDOR DE CONGELAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO

**GARANHUNS
2021**

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE
ANIMAIS DE PRODUÇÃO

DESIRÉE COELHO DE MELLO SEAL

EFEITOS DA ADIÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DA FOLHA DE *Moringa*
***Oleífera Lam.* AO DILUIDOR DE CONGELAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Animais de Produção da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Sanidade e Reprodução de Animais de Produção.

Orientadora: Prof (a). Dr (a). Maria Madalena Pessoa Guerra

FICHA CATALOGRÁFICA

Dissertação à disposição na Biblioteca Central da Universidade Federal Rural de Pernambuco. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às normas de ética científica.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

S438e Seal, Desirée Coelho de Mello
Efeitos da adição do extrato aquoso da folha de *Moringa oleífera*
lam. ao diluidor de congelação de sêmen caprino / Desirée Coelho de
Mello Seal. – 2021.
66 f. : il.

Orientadora: Maria Madalena Pessoa Guerra.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Sanidade e
Reprodução de Animais de Produção, Recife, BR-PE, 2022.
Inclui bibliografia.

1. Criopreservação de órgãos, tecidos, etc. 2. Sêmen 3. Moringa
4. Biotecnologia 5. Reprodução animal 6. Caprino I. Guerra, Maria
Madalena Pessoa, orient. II. Título

CDD 636.08926

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE
ANIMAIS DE PRODUÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Animais de Produção, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Sanidade e Reprodução de Animais de Produção, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às normas de ética científica

EFEITOS DA ADIÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DA FOLHA DE *Moringa Oleífera Lam.* AO DILUIDOR DE CONGELAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO

1 de 1



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE
ANIMAIS DE PRODUÇÃO

4ª Reunião Extraordinária para Defesa de Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Animais de Produção da Universidade Federal Rural de Pernambuco em 2021.

Às 14:00 (quatorze horas) do dia 17 de dezembro de 2021 reuniu-se via sistema de videoconferência Google Meet (link de acesso: meet.google.com/iim-kytv-oaw), a Banca Examinadora de Defesa de Dissertação, presidida pela **Profa. Dra. Maria Madalena Pessoa Guerra** para proceder à arguição e julgamento da Dissertação intitulada "**EFEITOS DA ADIÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DA FOLHA DE *Moringa Oleífera Lam.* AO DILUIDOR DE CONGELAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO**", defendida pela Mestranda **Desirée Coelho de Mello Seal**, com o objetivo de obter o título de Mestre. A Presidente da Banca Examinadora, dando início aos trabalhos, concedeu a palavra a candidata para uma breve apresentação de sua Dissertação. Em seguida, concedeu a palavra, por ordem, à Banca Examinadora assegurando a candidata o direito de resposta. Terminada a arguição, desenvolvida nos termos regimentais, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo atribuído a candidata os seguintes resultados:

Profa. Dra. Maria Madalena Pessoa Guerra (UFRPE) – Presidente - Aprovada

Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro– UFRPE (Titular) - Aprovada

Profa. Dra. Ellen Cordeiro Bento da Silva – UFRPE (Titular) - Aprovada

Sendo a aluna informada que, a partir desta data para os casos de aprovação com necessidade de reformulação e/ou correção sugerida pela banca examinadora, será concedido prazo máximo de 60 (sessenta) dias, para as correções e entrega dos exemplares finais. Caso este prazo não seja cumprido a aluna perderá o direito a receber a certidão e/ou diploma (Resolução 016/2014 CEPE-UFRPE).

Ciente: _____

Nada mais tendo a tratar, eu, **Prof. Dr. Marcelo Mendonça**, coordenador deste Programa, planejei e executei a presente ata, que achada conforme, segue assinada por todos.
Garanhuns, 17 de dezembro de 2021, às 17 horas 04 minutos.

Aos meus avós, Lucyneide Coelho de Mello e Aylton Bezerra de Mello (*in memoriam*).
Às minhas irmãs, à minha amada mãe e aos meus pais de sangue e de coração.

Dedico com todo meu amor!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade de realizar esse sonho;

Aos meus pais de sangue e de coração (Giselle Coelho, Carlos Seal, Elidiane Seal, Silvério Dinis), que sempre estiveram ao meu lado, me acompanhando e dando forças para continuar essa trajetória;

Às minhas irmãs, Jehanne Marie e Ana Leticia, que são tudo que tenho de mais precioso nessa vida, sem vocês nada seria possível;

A minha Dods linda (Lucyneide Coelho), por ser meu porto seguro e por não me deixar desistir um segundo sequer;

Ao meu voinho (Aylton Bezerra- *in memoriam*), que nos deixou no meio da pandemia, mas que sempre se orgulhou muito de mim e de quem sou hoje;

Ao meu companheiro de vida (Vitor Estênio), por toda paciência e cuidado durante os períodos de dificuldade;

À professora Maria Madalena Pessoa Guerra, primeiramente pela oportunidade e por todos os conselhos e mensagens de apoio sempre que precisei;

Ao professor André Mariano Batista, por todo apoio, atenção e amizade durante todo esse período. O senhor foi essencial para que tudo acontecesse! Muito obrigada por tudo e por tanto;

Aos meus grandes amigos que fazem a família ANDROLAB, Millena Monteiro, Lúcia Cristina, Robespierre Augusto, Jerônimo Hugo e Thalles Maciel, pelo carinho, apoio, amizade e incentivo.

Muito obrigada de todo meu coração!

“Crê em ti mesmo, age e verás os resultados. Quando te esforças, a vida também se esforça para te ajudar”

(Chico Xavier)

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da adição do extrato aquoso de folhas de *Moringa oleifera* (MO) em diferentes diluidores de criopreservação de sêmen caprino (Leite desnatado e Tris-gema de ovo) sobre os parâmetros de cinética, viabilidade espermática e ultraestrutura espermática por meio de microscopia eletrônica de varredura, pós-descongelamento. Seis *pools* de sêmen, obtidos de quatro reprodutores caprinos, foram congelados em diluidor à base de leite desnatado (LD) ou Tris-gema de ovo (TGO), suplementados com diferentes concentrações de MO (0, 1, 2 e 5 mg/mL). Após a descongelamento, as amostras foram avaliadas quanto aos parâmetros cinéticos, de viabilidade (integridade de membranas plasmática e acrossomal) e ultraestruturas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A suplementação com extrato de MO no diluidor de leite, na concentração de 5mg/mL influenciou nos parâmetros de cinética espermática (WOB e SRT), sendo esses valores obtidos menores ($p < 0,05$) do que os dos grupos controle, grupos LD1 (1 mg/mL) e LD2 (2mg/mL). Observou-se que os grupos LD1 (1 mg/mL), LD2 (2mg/mL) e LD5 (5 mg/mL) apresentaram menor ($p < 0,05$) integridade de membrana, quando comparados ao LD (controle). Já a suplementação com extrato de MO no diluidor a base de TGO, o único parâmetro cinético influenciado foi o WOB, sendo os valores de TGO1 (1mg/mL), TGO2 (2mg/mL) e TGO5 (5mg/mL) menores ($p < 0,05$) que os valores do grupo controle (TG). De acordo com a avaliação da ultraestrutura espermática (MEV), o extrato de MO, independente do diluidor utilizado, danificou as membranas das células espermáticas, de forma dose-dependente. Conclui-se que o extrato aquoso de folhas de MO, em diluidor à base de leite desnatado ou Tris-gema de ovo, nas concentrações 1, 2 e 5 mg/mL, afeta os parâmetros de progressividade espermática (WOB e STR), e provoca danos à membrana plasmática, de forma dose-dependente.

Palavras-chave: Antioxidantes, flavonoides, ROS, bode.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of the addition of the aqueous extract of *Moringa oleifera* (MO) in different extenders of cryopreservation of goat semen (Skimmed Milk and Tris Egg Yolk) on the parameters of kinetics and spermatic viability, after thawing. Six semen pools, obtained from four goat breeders, were frozen in skimmed milk (LD) or Tris-egg- yolk (TGO) extenders supplemented with different concentrations of MO (0, 1, 2 and 5 mg/mL). After thawing, the samples were evaluated for kinetic parameters, viability (integrity of plasma and acrosome membranes) and ultrastructures by scanning electron microscopy (SEM). Supplementation with MO extract in the milk extender at the concentration of 5mg/mL influenced the parameters of spermatic kinetics (WOB and SRT), and these values were obtained lower ($p < 0.05$) than those of the control groups, groups LD1 (1 mg/mL) and LD2 (2mg/mL). It was observed that groups LD1 (1 mg/mL), LD2 (2mg/mL) and LD5 (5 mg/mL) presented lower ($p < 0.05$) membrane integrity when compared to LD (control). Also, the supplementation with MO extract in the extender based on TGO, the only kinetic parameter influenced was the WOB, and the values of TGO1 (1mg/mL), TGO2 (2mg/mL) and TGO5 (5mg/mL) were lower than the values of the control group ($p < 0.05$). According to sperm ultrastructure evaluation by SEM, the MO extract, regardless of the extender used, damaged the membrane of the spermatic cells in a dose-dependent manner. It can be concluded that the aqueous extract of MO leaves, in extender based on skimmed milk or Tris-egg yolk, at concentrations 1, 2 and 5 mg/mL, affected the parameters of spermatic progressivity (WOB and STR), and caused damage to the plasma membrane, in a dose-dependent way.

Keywords: Antioxidants, flavonoids, ROS, goat.

LISTA DE FIGURAS

| | | Página |
|------------------|--|-----------|
| Figura 1 | Estrutura Química da Rutina..... | 11 |
| Figura 2 | Estrutura Química da Vitexina..... | 11 |
| Artigo | Extrato aquoso das folhas de <i>Moringa oleifera lam</i> adicionado a diluidores de congelação danifica membranas espermáticas caprina | |
| Figura 1. | Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência..... | 35 |
| Figura 2 | Espermatozoides caprinos, após congelação em diluente à base de Leite Desnatado, adicionado de diferentes concentrações de extrato aquoso de folhas de <i>Moringa oleifera</i> , obtidas em microscópio eletrônico de varredura..... | 39 |
| Figura 3 | Espermatozoides caprinos, após congelação em diluente à base de Tris-Gema de ovo, adicionado de diferentes concentrações de extrato aquoso de folhas de <i>Moringa oleifera</i> , obtidas em microscópio eletrônico de varredura.. | 43 |

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|---|-----------|
| Tabela 1 Valores médios dos parâmetros cinéticos de espermatozoides caprinos, após congelação em diluente à base de leite desnatado, adicionado de diferentes concentrações (1mg/mL, 2mg/mL ou 5mg/mL) de extrato aquoso de folhas de <i>Moringa oleifera</i> | 36 |
| Tabela 2 Percentuais de espermatozoides caprinos portadores de membrana plasmática (iMP) e membrana acrossomal (iAC) íntegras, após congelação em diluente à base de leite desnatado, adicionado de diferentes concentrações (1mg/mL, 2mg/mL ou 5mg/mL) de extrato aquoso de folhas de <i>Moringa oleifera</i> e avaliados em microscopia de epifluorescência..... | 37 |
| Tabela 3 Valores médios dos parâmetros cinéticos de espermatozoides caprinos, após congelação em diluente à base de Tris-Gema de ovo, adicionado de diferentes concentrações (1mg/mL, 2mg/mL ou 5mg/mL) de extrato aquoso de folhas de <i>Moringa oleifera</i> | 41 |
| Tabela 4 Percentuais de espermatozoides caprinos portadores de membrana plasmática (iMP) e membrana acrossomal (iAC) íntegras após congelação em diluente à base de Tris-Gema de ovo, adicionado de diferentes concentrações (1mg/mL, 2mg/mL ou 5mg/mL) de extrato aquoso de folhas de <i>Moringa oleifera</i> e avaliados em microscopia de epifluorescência..... | 42 |

SUMÁRIO

Página

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA..... | 3 |
| 2.1 A Célula Espermática..... | 3 |
| 2.2 Diluidores de Sêmen Caprino | 4 |
| 2.2.1 Diluidor à Base de Leite Desnatado..... | 4 |
| 2.2.2 Diluidor à Base de Gema de Ovo | 5 |
| 2.3 Processo de Criopreservação do Sêmen | 6 |
| 2.4 Produção de ROS e Estresse Oxidativo | 7 |
| 2.5 Antioxidantes | 8 |
| 2.5.1 <i>Moringa oleifera</i> | 9 |
| 2.6 Métodos de Avaliação Espermática..... | 12 |
| 2.6.1 Sistema Automático de Análise Seminal (CASA)..... | 12 |
| 2.6.2 Microscopia de Epifluorescência | 13 |
| 2.6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)..... | 15 |
| 4. REFERÊNCIAS | 16 |
| Artigo: Extrato aquoso das folhas de <i>Moringa oleifera lam</i> adicionado a | 26 |
| diluidores de congelamento danifica membranas espermáticas caprina | |
| 3 CONCLUSÃO | 47 |

1 INTRODUÇÃO

A criação de caprinos é uma atividade bastante rentável, com grande tradição cultural na região Nordeste, chegando a movimentar R\$ 290 milhões no ano de 2017. O crescimento e desenvolvimento desta atividade na região está ligado ao fácil processo de adaptação destes animais ao clima e à disponibilidade de alimentos para eles (EMBRAPA, 2018).

Há uma crescente demanda por produtos da espécie caprina nos grandes centros populares, principalmente no que se diz respeito a carne desses animais (QUADROS, 2017). Entretanto, nessas regiões são encontrados criatórios de subsistência familiar, caracterizados por baixo desempenho produtivo, devido a entraves que impossibilitam o criador de ampliar o perfil econômico na ovinocaprinocultura (LINS et al., 2016). Segundo Costa (2009), há necessidade de expansão do processo tecnológico na produção dessa espécie, devendo ser identificados pontos específicos que, se melhorados, possam aumentar sua produtividade.

Um dos pontos identificados para melhoria do processo técnico científico da cadeia produtiva de caprinos é o uso de tecnologias que possam melhorar a qualidade genética dos rebanhos e a quantidade de animais, em um menor espaço de tempo (MOLENTO et al., 2004). A seleção de machos reprodutores tem sido considerada de alta relevância para melhoria da eficiência reprodutiva do rebanho, uma vez que esses animais podem servir a um número maior de fêmeas ou até mesmo ser utilizados no processo de criopreservação de sêmen, objetivando o uso de biotécnicas da reprodução como a inseminação artificial (BAJUK et al., 2018).

No intuito de se obter uma manutenção da viabilidade espermática, o processo de congelação é bastante empregado e associado a inseminação artificial. Há diversos fatores que podem influenciar na fertilidade do sêmen congelado, dentre eles a duração do processamento, a temperatura de estocagem (-196 °C) e o diluente utilizado (USTUNER et al., 2015). Além do cuidado com o tipo de diluidor utilizado no processo de congelação, há também outros fatores que podem influenciar negativamente a taxa de fertilidade.

O estresse oxidativo (EO) tem sido demonstrado ser um dos principais desafios do processo de criopreservação, já que durante o EO há redução da integridade de

membrana, como também da motilidade progressiva dos espermatozoides (SANTOS et al., 2015). Embora a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) seja necessária para o processo de capacitação espermática, o desequilíbrio na produção e utilização dessas moléculas pode levar a danos nas células espermáticas (SOUZA et al., 2017).

A adição de produtos com atividade antioxidante aos diluidores de sêmen vem se mostrando como uma alternativa viável para criopreservação seminal, uma vez que sua utilização pode evitar lesões decorrentes do processo de oxidação (SÁNCHEZ-RUBIO et al., 2018). Dentre as classes de antioxidantes, destacam-se os flavonoides, compostos que também podem ser utilizados em adição ao diluidor, auxiliando na remoção das ROS ou na minimização dos efeitos negativos destas (SILVA, 2010).

A *Moringa oleifera* Lam, planta arbórea nativa da Ásia, encontrada em regiões tropicais, é uma hortaliça perene que apresenta baixo custo de produção e boa adaptação a períodos de estiagem (KARADI et al., 2006). A moringa é conhecida por apresentar grande quantidade de minerais, vitaminas e proteínas, além de possuir elevados teores de antioxidantes (XU, CHEN, GUO, 2019), sendo a presença de alguns constituintes químicos, como os ácidos fenólicos e flavonoides, responsáveis por tornar o extrato da folha da moringa um composto com atividade antioxidante bastante relevante.

Embora existam evidências de que a *Moringa oleifera* apresente papel antioxidante, auxiliando na proteção espermática durante o processo de congelamento de sêmen caprino, quando adicionada ao diluidor à base de gema de ovo + CEP2 (WAHJUNINGSIH et al., 2018), há a necessidade de investigação dos efeitos desse composto aos diferentes diluidores comumente utilizados na congelamento de sêmen caprino. Desta forma, objetivou-se avaliar os efeitos da adição do extrato aquoso da folha da *Moringa oleifera* aos diluidores à base de leite desnatado (LD) ou Tris-gema de ovo (TGO) utilizados na congelamento de sêmen caprino.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Célula Espermática

O espermatozoide é o gameta masculino produzido nos testículos a partir de células primordiais durante o processo de espermatogênese. Estes gametas são maturados no epidídimo e liberados em associação às secreções das glândulas acessórias (HAFEZ; HAFEZ, 2004). A produção espermática está diretamente relacionada à massa testicular, uma vez que testículos que apresentam um maior volume podem ser capazes de produzir maior número de espermatozoides (SIQUEIRA; GUIMARÃES; PINHO, 2013).

Os espermatozoides de mamíferos são altamente compartimentalizados e suas duas maiores porções são a cabeça, a qual possui núcleo e grânulos acrossomais, e o flagelo, compreendendo o axonema, mitocôndrias e fibras densas (LEITE, 2012).

A célula espermática é coberta por uma membrana plasmática que é responsável por agrupar os componentes intracelulares e as organelas de forma semipermeável, mantendo seu gradiente químico de íons (SILVA; GADELLA, 2006). A integridade desta membrana é essencial para que se obtenham maiores índices de fertilização, uma vez que, desta forma, o espermatozoide pode sofrer a capacitação espermática e reação acrossômica como esperado (ROLDAN, 2019).

A cabeça do espermatozoide contém o acrossoma, que é composto por um grande complexo de Golgi, responsável pela secreção de enzimas hidrolíticas (SILVA, 2010). Sua importância se dá pela relação direta com o processo de ligação do espermatozoide à zona pelúcida, sendo necessário que haja a liberação e ativação dessas enzimas. O acrossoma deve-se manter intacto até o momento de contato com a zona pelúcida. Entretanto, durante os processos de refrigeração, congelamento e armazenamento espermático, pode ocorrer a quebra dessa integridade, danificando assim o espermatozoide e, conseqüentemente, prejudicando sua capacidade fertilizante (HONDA; SIRUNTAWINETI; BABA, 2002).

O núcleo espermático, por sua vez, é responsável por manter a cromatina condensada, a qual possui todas as informações genéticas. Caso hajam danos à cromatina, torna-se improvável o processo de desenvolvimento embrionário (PESCH; BERGMANN, 2006). Portanto, o estado da cromatina espermática é tido como um parâmetro indicativo de potencial fertilizante espermático (SIMÕES et al., 2014).

A peça intermediária é encontrada na cauda dos espermatozoides e é responsável pela geração de energia para movimentação e sobrevivência espermática (SINGH et al., 2006).

As mitocôndrias encontradas na peça intermediária são responsáveis pela produção de ATP, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), apoptose e equilíbrio transmembrana do cálcio (RAMALHO-SANTO; AMARAL, 2013). A energia necessária para diversas funções espermáticas é proveniente da fosforilação oxidativa, como também da glicólise. O processo de fosforilação oxidativa, também conhecido como respiração celular, se dá por meio da atividade das mitocôndrias e alguns autores afirmam que a quantidade de mitocôndrias com alto potencial pode estar relacionada a uma maior competição espermática (TOURMENTE; ROLDAN, 2015).

2.2 Diluidores de Sêmen Caprino

2.2.1 Diluidor à base de leite desnatado

Os diluidores à base de leite são considerados meios com baixo custo de produção, de fácil preparo e que apresentam uma boa conservação espermática (AURICH, 2008). O leite desnatado contém proteínas, dentre elas a caseína, que se destaca por sua ação tamponante, sendo responsável pela diminuição de danos causados à célula espermática durante o processo de congelação como também pela melhoria nos parâmetros de cinética espermática (SALOMON; MAXWELL, 2000). Há outras partículas encontradas no leite que são benéficas à célula espermática, como a lactose, que apresenta função energética (CUNHA, 2002).

Uma grande variedade de diluentes, combinando vários componentes como soluções tampões, eletrólitos açucars, gema de ovo e leite, têm sido desenvolvidos para melhorar a qualidade espermática após o processo de congelação/descongelação do sêmen de pequenos ruminantes (MAIA et al., 2005). Para alguns pesquisadores odiluidor à base de leite desnatado é o mais indicado na criopreservação de sêmen caprino (PURDY, 2006).

Apesar de o leite apresentar ótimas características como diluidor, o sêmen caprino apresenta algumas particularidades que limitam seu uso, principalmente devido

à presença de grande quantidade de fosfolipídeos (LEBOEUF et al., 2000).

De acordo com LEBOEUF et al. (2000), há uma proteína produzida a partir da glândula bulbouretral de caprinos que é responsável por hidrolisar os triglicerídeos encontrados no leite desnatado, resultando, conseqüentemente, em uma grande quantidade de compostos tóxicos para a célula espermática. No entanto, para que esse processo seja evitado, há indicação de aquecimento do diluidor a 90 °C / 10 min, objetivando a inativação dos fosfolipídios presentes em grandes quantidades no leite (TREJO et al., 1987).

Segundo Evans e Maxwell (1987), o diluidor à base de leite desnatado mantém a viabilidade espermática por até 12 horas em refrigeração a 5 °C e, segundo Dorado et al (2007), este tipo de diluidor (à base de leite desnatado) promove maior taxa de gestação em ovinos, quando comparado aos diluidores à base de Tris-gema de ovo.

Nos estudos realizados por Kasimanickam et al. (2011), diluidores à base de Tris-gema de ovo e leite desnatado foram comparados e não apresentaram diferença significativa, quando avaliados o potencial de membrana mitocondrial e a motilidade progressiva dos espermatozoides.

2.2.2 Diluidor à Base de Gema de Ovo

Diluidores à base de gema de ovo são difusamente conhecidos ao redor do mundo, desde que seu uso para conservação espermática foi citado por Phillips e Lardy (1940), provando seu benefício durante os protocolos de criopreservação de sêmen bovino.

Segundo Lima et al. (2019), a utilização de diluente à base de gema de ovo adicionada de açúcares, durante o processo de criopreservação, melhora a qualidade dos parâmetros espermáticos pós-descongelamento e reduz o número de células espermáticas danificadas, uma vez que a gema de ovo é responsável por proteger estas células contra o choque de temperatura. De acordo com Holt (2000) a gema de ovo age protegendo a membrana plasmática por meio da proteção contra efeitos negativos da mudança de temperatura durante o processo de criopreservação.

Mesmo sendo um diluidor de bancada bastante utilizado, o mecanismo de ação e a função desempenhada pela gema de ovo no diluidor de sêmen ainda não foi totalmente elucidada (SILVA e GUERRA, 2011). Sabe-se que a gema possui propriedades nutritivas e protetoras à membrana espermática (CÂMARA et al., 2018).

A gema de ovo é geralmente utilizada na concentração de 20% e, segundo

Bergeron e Majunath (2006), a associação das lipoproteínas de baixa densidade com a membrana espermática, promove proteção à membrana, devido a sua estabilização. Acredita-se que ocorra perda de fosfolípidios durante o processo de congelação/descongelação e a presença das lipoproteínas de baixa densidade são responsáveis por aderir à membrana espermática, alterando sua composição de forma momentânea, evitando, assim, os efeitos deletérios da congelação, como a ruptura da membrana (FARSTARD, 1996).

Carvalho et al. (2008) estudaram o efeito dos diluentes Tris-gema de ovo (TG), Leite-gema de ovo (LG) e Tris-Gema-Leite (TGL) sobre a diluição e a criopreservação de sêmen ovino. Estes autores observaram que no diluente TG, os espermatozoides apresentaram motilidade progressiva (46,5%) superior àquelas células preservadas com os diluentes LG (26,1%) e TGL (32,1%), após descongelação.

Em estudo realizado por Paulenz et al. (2003), foi observado que diluidores à base de gema de ovo apresentaram maior capacidade de proteção à célula espermática, quando comparados aos diluidores à base de leite, após 30 horas de armazenamento.

2.3 Processo de Criopreservação de Sêmen

A exigência cada vez maior de sêmen proveniente de animais de alto valor genético, encontrados em diversas partes do mundo, tem sido um grande incentivo para a busca de biotécnicas da reprodução que assegurem um armazenamento de qualidade, objetivando uma maior criosobrevivência e culminando em menores danos espermáticos durante o processo de criopreservação a baixas temperaturas (VISHWANATH; SHANNON, 2000).

A criopreservação espermática é uma biotécnica responsável por trazer diversos benefícios à reprodução animal, podendo ser destinada a animais de produção, como também à conservação de espécies ameaçadas de extinção (WATSON, 2000). A criopreservação pode ser empregada por meio de refrigeração de sêmen, no intuito de utilização por, no máximo, 72 horas, como também empregando-se o meio de congelação seminal, o qual permite um armazenamento a baixas temperaturas em nitrogênio líquido, por tempo indeterminado (YOSHIDA, 2000).

O processo de refrigeração do sêmen caprino ocorre nas faixas que variam de 2 a 15 °C (LEBOEUF, RESTALL; SALAMON, 2000). Durante esse processo, há uma

redução da atividade espermática, resultando em diminuição da motilidade e da atividade metabólica celular (MACHADO; SIMPLICIO 1995). Já o processo de congelação, permite que os espermatozoides atinjam uma curva de congelação negativa, chegando a -196 °C.

O choque térmico que ocorre durante o processo de criopreservação é considerado inevitável, uma vez que os espermatozoides são submetidos a uma redução de temperatura bastante significativa. Os efeitos deletérios do processo culminam em danos à membrana plasmática, aumento do processo de peroxidação lipídica, além de diminuição do potencial mitocondrial e lesões no acrossoma causado por estresse osmótico e oxidativo, durante a congelação/dcongelação (SOARES; GUERRA, 2009).

Os danos à membrana, associados ao processo de criopreservação, podem ocorrer devido às alterações na composição da membrana espermática, a qual é rica em fosfolipídios, como a fosfatidilcolina, esfingomiélin e alguns ácidos graxos poli-insaturados (SILVA et al., 2009). Para que sejam reduzidos os danos da criopreservação, é necessário que este processo seja realizado de forma cautelosa, uma vez que tais lesões são irreversíveis e levam à diminuição do seu potencial fertilizante (WATSON, 2000).

2.4 Produção de ROS e Estresse Oxidativo

Os agentes oxidantes/espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidos normalmente por organismos biológicos aeróbicos durante o processo de respiração. Entretanto, os metabolitos produzidos oriundos desse processo podem ser responsáveis por modificar ou danificar as células. A produção de ROS ocorre a partir do oxigênio utilizado, gerando o radical ânion superóxido (O_2^-), além do peróxido de hidrogênio e o grupamento hidroxila (RIVLIN et al., 2004).

Os espermatozoides produzem quantidades controladas de ROS, as quais, em condições fisiológicas, são responsáveis por induzir o processo de capacitação espermática, auxiliar na reação acrossômica e causar hiperativação dos espermatozoides (BURNAUGH et al., 2010). Segundo Guerra et al. (2004), quando há produção excessiva de ROS, ocorre uma redução da motilidade espermática, como também o aumento da peroxidação lipídica, afetando, conseqüentemente, a capacidade fertilizante da célula espermática (AURICH, 2008; MAIA; BICUDO, 2009).

O processo de manipulação seminal, sendo ele a refrigeração ou a congelação, é responsável por induzir uma maior produção de ROS, por meio de choque térmico, exposição ao próprio oxigênio atmosférico ou remoção de plasma seminal (WATSON, 2000). Além disso, a diluição espermática age diminuindo os níveis de antioxidantes naturais encontrados no plasma seminal, culminando, assim, em um desequilíbrio entre a produção de ROS e a presença de antioxidantes (NASCIMENTO et al., 2015).

O aumento das reações oxidativas causam danos a proteínas, lipídios, ácidos nucleicos (RNA e DNA), em virtude disso, resultando em peroxidação lipídica e danos às membranas plasmática, acrossomal, DNA e RNA (COMHAIRE et al., 1999; GUTHRIE; WELCH, 2012), ao potencial de atividade mitocondrial e à capacidade fertilizante dos espermatozoides (AITKEN et al., 2010).

O processo de criopreservação seminal requer a diluição espermática, como também a remoção do plasma seminal de algumas espécies, sendo esses processos responsáveis pelo desequilíbrio entre as concentrações de oxidantes e antioxidantes, uma vez que a remoção de plasma requer o processo de centrifugação da amostra, a qual pode levar a danos estruturais espermáticos (BILODEAU et al., 2000).

Diante disso, o uso de aprimoramentos das biotécnicas da reprodução, como a adição de antioxidantes ao diluidor seminal, objetivando a diminuição dos níveis de ROS, é considerada uma alternativa viável na tentativa de melhorar a qualidade seminal, pós descongelação.

2.5 Antioxidantes

Os antioxidantes são compostos encontrados no plasma seminal que podem auxiliar retardando ou inibindo a oxidação de moléculas biológicas. No entanto, diversos estudos realizados em bovinos, ovinos e equinos demonstram que há grande produção de ROS durante o processo de congelação e descongelação, sendo muitas vezes necessária uma suplementação com antioxidantes (MATA-CAMPUZANO et al., 2014).

O sêmen possui antioxidantes como a glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase, as quais podem auxiliar na proteção espermática, melhorando sua motilidade e viabilidade, protegendo, assim, contra os efeitos da peroxidação lipídica (ROLDAN et al., 2019). Diversos grupos de pesquisa têm buscado testar o efeito da adição de antioxidantes, tanto na dieta quanto diretamente no diluidor, durante o processo de criopreservação de sêmen em diversas espécies, objetivando uma melhor qualidade seminal (SOARES; GUERRA, 2009).

Segundo Silva et al., (2016), o uso de quercitina em altas concentrações adicionado a sêmen de caprino, melhorou os parâmetros de cinética espermática após o processo de descongelação. Já Soares et al. (2010), afirmam que a adição dos antioxidantes Trolox - GSH ao diluidor a base de Tris- gema apresentou um efeito crioprotetor durante o processo de congelação de sêmen ovino. Os antioxidantes extraídos de plantas tem ganhado cada vez mais espaço em diluidores utilizados para conservação espermática, uma vez que se trata de um composto natural e com diversas outras funcionalidades.

Dentre os fitoquímicos utilizados, destacam-se os flavonoides. Composto antioxidante capaz de desempenhar seu papel sequestrando radicais livres, regulando a produção desses radicais, eliminando precursores dos radicais, quelando metais ou elevando os níveis de antioxidantes endógenos (XU, CHEN; GU, 2019).

A classe dos flavonoides é caracterizada como compostos polifenólicos produzidos a partir da via dos fenilpropanoides e do acetato, precursores de vários grupos de substâncias, como ácidos graxos, terpenos e alguns aminoácidos (MANN, 1987).

São normalmente encontrados em frutas, vegetais, sementes, folhas e flores e apresentam grande quantidade de radicais hidroxila, fazendo de sua composição um potente antioxidante (MORETTI et al., 2012). Apresentam função antioxidante pela sua capacidade de sequestrar radicais livres e quelar íons metálicos como também agem estabilizando a membrana espermática (GALATI et al., 2002).

Os flavonoides diferem entre si por sua estrutura química e características particulares e seu poder antioxidante pode ser determinado por fatores como: agente doador de H e elétrons, estabilidade do radical flavanoil formado; reatividade perante outros antioxidantes; capacidade de quelar metais de transição, interação com a membrana plasmática (BARREIROS et al., 2006)

2.5.1 *Moringa oleifera*

A *Moringa oleifera* Lam. é uma planta da família das Moringaceae, que apresenta tamanho mediano e desenvolve-se bastante em regiões de clima tropical. Suas

folhas são conhecidas por apresentarem altos níveis de proteínas, minerais e vitaminas, além de serem uma grande fonte de antioxidantes (SIDDIQ et al., 2005).

A moringa é conhecida como árvore da vida, devido às suas propriedades presentes tanto na folha quanto no caule e na semente. Dentre os seus componentes encontrados, há também, segundo Xu, Chen e Guo (2019), a presença de flavonoides em todas as suas partes, porém a maior quantidade é encontrada nas folhas da moringa, sendo considerada uma melhor fonte de antioxidantes e antiinflamatórios.

Além de sua característica antioxidante, a moringa apresenta ação hipotensiva, antiespasmódica, antiulcerativa, antiinflamatória, atividade hipoglicêmica e também apresenta bons resultados quando utilizada como agente antimicrobiano (XU; CHEN; GUO, 2019).

Com a busca por componentes naturais que possam ser adicionados a diluidores de sêmen, com o objetivo de reduzir os danos causados pelo processo de congelação, a *Moringa oleifera* surge como uma opção viável, de fácil acesso e que apresenta características de um potente antioxidante.

A presença dos flavonoides encontrados na folha da *M. oleifera* apresenta um mecanismo responsável por sequestrar diretamente os oxidantes formados durante o processo de congelação, regulando sua produção, eliminando precursores dos radicais e quelando metais (SIDDIQ et al., 2005).

Alguns estudos com a *Moringa oleifera* demonstraram que o uso do extrato etanólico apresentou capacidade de melhorar a libido dos animais e a qualidade espermática (PRABSTTRO et al., 2015). Segundo Wahjuningsih et al. (2019), a adição de 5% de extrato de *Moringa oleifera* ao diluidor CEP-2 + gema de ovo, preservou a qualidade do sêmen de caprinos durante o processo de criopreservação.

Dentre os compostos antioxidantes da *Moringa oleifera*, são encontrados diversos flavonoides, como a rutina e a vitexina. Além da presença dos antioxidantes, sua ação pode ser potencializada pela presença de compostos como betacaroteno, vitamina C, vitamina E e polifenóis. Esta combinação torna sua atividade antioxidante superior a de outros antioxidantes naturais (KIM et al., 2012).

Recentemente, tem se realizada uma maior busca por antioxidantes naturais, e a vitexina e a rutina tem ganhado espaço nesse meio, devido a suas capacidades antioxidantes (BABAIEI, 2020).

A rutina (Figura 1) e a vitexina (Figura 2) são flavonas C- glicosidas, ligadas à posição 3 do anel pirano, amplamente distribuídas no reino vegetal. Estas substâncias são consideradas antioxidantes potentes, capazes de doar elétrons e agir como bons eliminadores de radicais livres. Após reações com espécies reativas de oxigênio, os radicais mais estáveis foram reportados em 4'-OH, 7-OH e 5-OH, respectivamente (PRAVEENA; SADASIVAM; KUMARESAN, 2013). A afinidade desses glicosídeos pela membrana das células exerce um importante papel na absorção de compostos lipofílicos (BECHO et al., 2009).

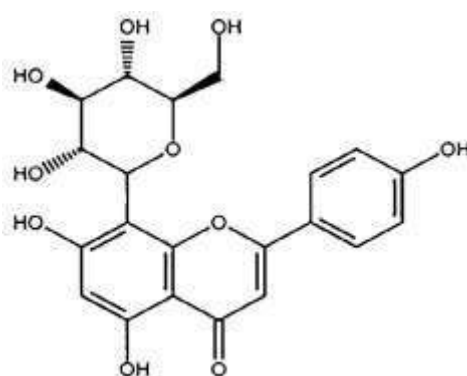


Figura 1. Estrutura química da rutina (BECHO et al., 2009).

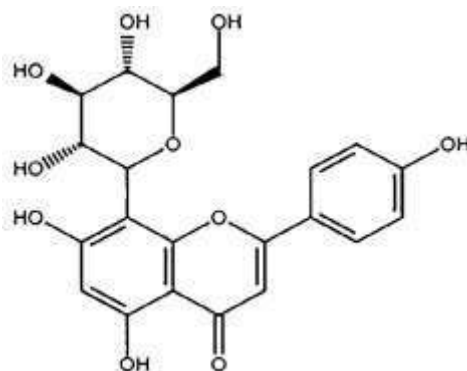


Figura 2. Estrutura química da vitexina (BABAEI et al., 2020).

2.6 Métodos de Avaliação Espermática

2.6.1 Sistema Automático de Análise Seminal (CASA)

A avaliação para detecção da qualidade seminal têm sido realizada principalmente por meio do estudo da morfologia e da motilidade espermática, sendo essas avaliações muitas vezes realizada de forma subjetiva. Entretanto, visando a diminuição da subjetividade, sistemas automáticos de análise seminal (CASA) tem sido utilizados de forma mais frequente, apresentando maior confiabilidade e padronização das análises (MATOS et al., 2008).

O CASA é um sistema automatizado utilizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens, e, por meio dessas análises, é capaz de fornecer informações precisas sobre a cinética celular individual e de grupos espermáticos (AMANN; KATZ, 2004), além de fornecer valores estatísticos da população analisada (MATOS et al., 2008).

Entretanto, para que a análise seja realizada de forma efetiva, é necessário muito cuidado no preparo das amostras e no ajuste do equipamento, uma vez que as variáveis se alteram de acordo com a identificação da espécie (VERSTEGEN et al., 2002). Mesmo diante de um equipamento com grande potencial, ainda há alguns entraves devido ao alto custo para obtenção, como também ao controle de qualidade das amostras. Além disso, é necessária a padronização das configurações para uso do sistema, uma vez que quanto mais padronizado, maior a facilidade em se comparar dados (AMANN; KATZ, 2004).

Dentre as avaliações realizadas pelo sistema CASA, a motilidade espermática é avaliada mediante um sistema estroboscópico de precisão controlada pelo computador. Já a análise sequencial do movimento espermático é realizado por meio de videomicrografia (MORTIMER, 2000; AMANN; KATZ, 2004).

Sabe-se que o movimento de flagelo é responsável por originar a motilidade espermática. Entretanto, os sistemas automáticos tem por objetivo avaliar também o movimento de cabeça espermática, pois a mesma não se move tão rapidamente quanto a cauda, possibilitando uma captura de imagem mais acurada (MORTIMER, 2000; AMANN; KATZ, 2004). Como o espermatozoide muitas vezes está em meio de congelamento, são observadas algumas partículas na imagem capturada. Por isso, o sistema CASA utiliza um padrão para o tamanho de cabeça, a fim de que o computador

possa reconhecer objetos que não se enquadrem no tamanho de cabeça espermática daquela espécie estudada (MORTIMER, 2000).

Há uma série de parâmetros analisados pelo sistema CASA e cada um deles apresenta a descrição de uma funcionalidade. A motilidade total (%) é observada pela população de células que estão se movendo com uma velocidade mínima. A Motilidade progressiva (%) é tida como a porcentagem de células que se movem progressivamente. A velocidade curvilínea (VCL; $\mu\text{m/s}$) é a velocidade da trajetória real do espermatozoide, sendo um dos elementos utilizados para calcular a linearidade. Já a velocidade linear progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$) é tida como a velocidade média, em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozoide, sempre a mais baixa das três velocidades. Velocidade média da trajetória (VAP; $\mu\text{m/s}$) consiste na velocidade da trajetória média ininterrupta do espermatozoide. A amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH; μm) corresponde à amplitude do deslocamento médio da cabeça do espermatozoide, em sua trajetória real. A Frequência de batimento flagelar cruzado (BCF; Hz) é calculada pelo número de vezes que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento, move-se para trás e para frente durante o trajeto percorrido. A retilinearidade (STR; %) compreende o valor médio entre VSL e VAP, e estima a proximidade do percurso da célula a uma linha reta. A linearidade (LIN; %) refere-se ao valor médio da proporção entre VSL e VCL (VERSTEGEN et al., 2002).

O sistema CASA permite a avaliação de características celulares de forma precisa, sendo utilizada em pesquisas de monitoramento da qualidade espermática, pesquisa de novos diluidores, além de auxiliar no conhecimento e na habilidade de manipulação espermática, ofertando cada vez mais dados fidedignos (MATOS et al., 2008).

2.6.2 Microscopia de Epifluorescência

Cada vez mais o uso de novos equipamentos para análise seminal tem sido utilizados, uma vez que é essencial um conjunto de avaliações para a predição da fertilidade espermática. Diversas técnicas tem sido utilizadas, entretanto até o momento nenhuma de forma isolada foi suficiente para atestar a fertilidade dos gametas (BERGSTEIN; BICUDO, 2014).

As sondas fluorescentes tem sido bastante utilizadas em conjunto com os dados do sistema CASA, uma vez que atestar uma boa motilidade não garante integridade de membrana acrossomal e espermática, os quais são essenciais para o processo de fecundação (GARCIA et al, 2007).

A utilização de um microscópio de fluorescência com sondas fluorescentes específicas permite a avaliação e a identificação de danos espermáticos, facilitando, assim, os estudos de fertilidade (SILVA; GUERRA, 2012).

Para a análise da integridade da membrana plasmática podem ser utilizadas sonda fluorescentes não penetrantes nas membranas integras (AURICH, 2005; SILVA; GADELLA, 2006). Dentre elas, se destaca o Iodeto de propídio (IP), o qual possui afinidade pelo DNA, penetrando na célula se a membrana espermática estiver danificada, com emissão da cor vermelha. Há também a possibilidade do uso de corantes penetrantes, isolados ou em associação, como o Diacetato de carboxifluoresceína (DCF) + IP. O DCF é um éster polar que penetra na membrana plasmática intacta, florescendo em verde (MEDINA et al., 2000; AURICH, 2005; SILVA; GADELLA, 2006).

O potencial de membrana mitocondrial (PMM), por sua vez, visa avaliar o risco apoptótico da célula, uma vez que baixos PMM podem estar relacionados a sinal de estresse causado pelo aumento da produção de ROS (GUERRA et al., 2012). Para avaliação do PMM, uma sonda fluorescente denominada JC-1 é utilizada (ARRUDA et al., 2007, agindo de forma a polarizar a membrana mitocondrial interna (SILVA; GADELLA, 2006). Quando o corante penetra nesta organela, ocorre a emissão de fluorescência vermelha ou verde, sendo vermelha naquela portadora de alto potencial mitocondrial e verde nas que possuem baixo potencial mitocondrial (ARRUDA et al., 2007).

Uma outra análise realizada mediante o uso da microscopia de fluorescência é a avaliação da integridade acrossomal, podendo ser utilizadas lecitinas, os anticorpos capazes de detectar antígenos internos ao acrossomo, como também as clortetraciclina e os anticorpos contra antígenos acrossomais externos (GARCIA et al, 2007).

As lecitinas conjugadas às sondas fluorescentes, agem interagindo com glicoconjugados localizados no acrossoma (ARRUDA, 2007). As lecitinas utilizadas durante o processo pode ser o FITC-PNA e o FITC- PSA , possuem especificidade a glicoproteínas da membrana acrossomal, apresentando afinidade para as terminações Alfa- D- glicosil e resíduos de Alfa- D- manosil de glicoproteínas, se ligando especificamente ao açúcar alfa- manosidase encontrado no conteúdo acrossomal. Essa

aglutinina quando conjugada a isocianato de fluoresceína (FITC), marca com sucesso o acrossoma espermático em verde, facilita a visualização e identifica acrossomas lesados, (GRAHAM, 2001).

2.6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O MEV é tido como um instrumento bastante utilizado em diversas áreas, apresentando uma ótima opção para análises microestruturais de materiais sólidos. Apesar de apresentar um mecanismo mais específico de preparo de material, a imagem obtida normalmente apresenta uma fácil interpretação (MANNHEIMER, 2002).

O MEV foi desenvolvido a partir do Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET). Entretanto o MEV apresenta uma resolução de imagem mais alta, correspondendo a, aproximadamente, de 2 a 5 nm, enquanto que na microscopia ótica essa resolução é de 0,5 μm (HENRIQUES, 2019).

Dentre todas as características do MEV, a elevada acuidade do foco, como também a possibilidade de combinar as análises (microestrutural e microanálise), faz do equipamento algo único e de grande importância técnico- científica. Sua funcionalidade se dá por um feixe de elétrons, ultrapassando toda superfície da amostra analisada, sendo transmitido para uma tela em que a varredura se encontra sincronizada com o feixe de elétrons. O sinal é então captado e modulado para o monitor, sendo possível a observação das características do material (DEADIVID et al., 2007).

Visando o preparo da amostra a ser analisada, é necessária a realização de um esfregão do material analisado em lâmina de vidro e imersão em solução de glutaraldeído (2,5%), uma vez que a amostra deve ser fixada. Durante o processo, a amostra sofre uma série de lavagens e fixações em diferentes concentrações de PBS e tetróxido de ósmio (1%) e por fim é desidratada em concentrações crescentes de etanol.

Para garantir a visualização do material, as lâminas são submetidas ao processo de secagem em ponto crítico e metalizadas com uma camada de ouro (JONES, 2012).

Por permitir a avaliação e a caracterização das ultraestruturas de forma bem clara, a utilização do MEV se mostra como uma ferramenta valiosa para avaliação seminal, sendo possível também observar, comprovar e comparar os danos sofridos durante o processo de criopreservação com os resultados de avaliações como integridade de membrana (BEZERRA, 2018).

O uso das avaliações do MEV são de grande importância na acuidade dos danos ocasionados na célula, podendo esses dados serem correlacionados a outras avaliações, como motilidade espermática, visto que para uma célula ser considerada viável, é necessário que a mesma apresente não só uma boa motilidade espermática, mas também integridade de membrana (ARRUDA et al., 2018).

REFERÊNCIAS

AITKEN, R.J.; ILULIIS, G.N.; FINNIE, J.M. et al. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. **Human Reproduction**, v. 10, p. 2415-2426, 2010.

AMANN, R.; KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v. 25, p. 317-325, 2004.

AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3-4, p. 268-275, 2008.

BABAEI, F.; MOAFIZAD, A.; DARVISHVAND, Z. et al. Review of the effects of vitexin in oxidative stress-related diseases. **Food Science & Nutrition**, v. 54, p. 138- 146, 2020.

BARRREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v. 9, n. 1, 2006.

BAJUK, B.P.; PHILAR, T.; POGACNIK, N. et al. Dialysis of the goat semen and its effect on the quality of frozen/thawed spermatozoa processed in the presence of egg yolk. **Animal Reproduction Science**, v. 198, p. 65-73, 2018.

BECHO, J.R.M.; MACHADO, H.; GUERRA, M.O. Rutina, estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 1, n. 1, p. 21 - 25, 2009.

BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular Reproduction and Development.**, v. 73, p. 1338-1344, 2006.

BEZERRA, L.G.P. **Descrição ultraestrutural de espermatozoides a fresco e criopreservados de catetos (pecari tajacu linnaeus, 1758)**. Dissertação. Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do semiárido, 2018.

BILODEAU, J.F.; CHATTERJEE, S. ; SIRARD, M.A.; GAGNON, C. Levels of antioxidant defense are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, p. 282-288, 2000.

BURNAUGH, L.; BALL, B. A.; SABEUR, K.; THOMAS, A. D.; MEYERS, S. A. Osmotic stress stimulates generation of superoxide anion by spermatozoa in horses. **Animal Reproduction Science**, v. 117, n. 3-4, p. 249-260, 2010.

CAMARA, T.S.; NUNES, T.G.P.; TONIOLLI, R. Diluentes seminais para pequenos ruminantes. **Ciência animal**, v. 28, p. 67-83, 2018.

CARVALHO, F.P.; SILVA, J.F.S.; SOUZA, G.V. et al. Diferentes diluentes sobre a motilidade e integridade de membrana plasmática após o congelamento e descongelamento de sêmen ovino. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 3, p. 612-620, 2008.

COMHAIRE, F.H.; MAHMOUD, A.M.A.; DEPUYDT, C.E.; ZALATA, A.A. et al. Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. **Human Reproduction Update**, v. 5, p. 393– 398, 1999.

COSTA, N.G.A Cadeia produtiva da carne ovina no Brasil rumo a novas formas de organização da produção. In: **Gestão e Organização no Agronegócio da Ovinocaprinocultura**. Brasília: Santa Clara, 2009. Cap. 3, p. 49-84.

CUNHA, I.C.N. **Criopreservação do sêmen de cães**. Tese Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.149p., 2002.

DORADO, J. RODRIGUES, L.; HIDALGO, M. Cryopreservation of goat spermatozoa: comparison of two based extenders based on post- thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. **Theriogenology**, v. 68, p. 168-177, 2007.

DEDAVID, B.A. **Microscopia Eletrônica de Varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of semen. In: **Salamon's artificial insemination of sheep and goats**. Wellington: Butterworths, 1987. p.122-141.

FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 251- 260, 1996.

GALATI, G.; SABZEVARI, O.; WILSON, J.X, et al. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. **Toxicology**, v. 177, n. 1, p. 91-104, 2002.

GARCÍA-MACÍAS, V.; PAZ, P.; MARTINEZ-PASTOR, F.; ÁLVAREZ et al. DNA fragmentation assessment by flow cytometry and Sperm-Bos-Halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull sperm. **International Journal of Andrology**, v. 30, p. 88–98, 2007.

GRAHAM, J.K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 239-247, 2001.

GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.H.C. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, p. 187-195, 2004.

GUERRA, M.M.P.; CÂMARA, D.R.; SILVA, E.C.B. Uso de antioxidante no sêmen ovino. **Ciência Animal**, v. 12, n. 1.2012.

GUTHRIE, H.D.; WELCH, G.R. Effects of reactive oxygen species on sperm function. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1700-1708, 2012.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**: 2004. 7.ed. São Paulo: Manole, 2004.

HENRIQUES, R.L. Utilização da microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliação da ação de cloretos em compósitos de matriz cimentícia. **Tese**. Universidade Federal de Minas Gerais, 2019

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 3-22, 2000.

HONDA, A.; SIRUNTAWINETI, J.; BABA, T. Role of acrosomal matrix proteases in sperm-zona pellucida interactions. **Human Reproduction**, v. 8, p. 405-412, 2002.

JONES, C.G. **Forensic Microscopy for Skeletal Tissues: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, vol. 915, Springer Science Business Media, LLC 2012.

KARADI, R.; GADGE, N.B.; ALAGAWADI, K.R. et al. Effect of Moringa oleifera Lam. Root-wood on ethylene glycol induce urolithiasis in rat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n. 1, p. 306-311, 2006.

KASIMANICKAM, R.; KASIMANICKAM, V.; TIBARY, A.; PELZER, K. Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4C. **Small Ruminant Research**, v. 99, p. 208-213, 2011.

KIM, S.; LEE, Y.; YANG, H.; KIM, Y. J. Rapid freezing without cooling equilibration in canine sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 130 p. 111– 18, 2012.

LEBOEUF B.; RESTALL B.; SALAMON S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal. Reproduction Science**, v. 62, p. 113-141, 2000.

LEITE, T.G. **Tempo de equilíbrio, lipoproteínas de baixa densidade e colesterol na criopreservação do sêmen bovino**. 2012. Tese (Doutorado em Ciência Animal)-Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.

LIMA, A.S.; BITTENCOURT, R.F.; FILHO, R.A.L. et al. Utilização da lipoproteína de baixa densidade, em diferentes concentrações, em meio diluidor para criopreservação do sêmen ovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 6, 2019.

LINS, J.G.G.; FERREIRA, T.L.A.; SEAL, D.C.M. et al. Caracterização das Práticas de Manejo Reprodutivo da Ovinocultura no Perímetro Irrigado das Várzeas de Sousa – Paraíba. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, n. 4, p. 317-319. 2016.

MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A. A. Inseminação artificial em caprinos no Brasil: estágio atual. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 19, n. 1- 2, p. 61-72.1995.

MAIA, M.S.; AZEVEDO, H.C.; BICUDO, S.D.; SOUSA, D.B.; RODELLO, L. Efeito da adição do Equex-STM ao diluente TRIS-gema na motilidade do espermatozoide criopreservado de carneiro. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 1, p. 311-311, 2005.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamífero: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 4, p.183-193, 2009.

MANN, J. **Secondary metabolism**. Oxford: Clarendon Press; 1987. p.374.

MANNHEIMER, W.A. **Microscopia dos materiais**, e-papers, 2002. ISBN:8587922548

MATA-CAMPUZANO, A.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; TAMAYO-CANUL, J. et al. Refrigerated storage of ram sperm in presence of Trolox and GSH antioxidants: effect of temperature, extender and storage time. **Animal Reproduction Science**, v. 151, p. 137-147, 2014.

MATOS, D.I.; ARAÚJO A.A.; ROBERTO, L.G., Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 4.; p. 225-232, 2008.

MORTIMER, S.T. Casa- Practical aspects. **Journal of Andrology**, p. 515-524, 2000.

MOLENTO, M.B.; TASCA, C.; GALLO A.K; FERREIRA, M.J. et al. Famacha© como parâmetro clínico individual de infecção por *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. **Ciência Rural**, v. 34 p. 1139-1145, 2004.

MORETTI, E.; MAZZI, L.; TERZUOLI, G. Effect of quercetin, rutin, naringenin and epicatechin on lipid peroxidation induced in human sperm. **Reproductive Toxicology**, v. 34, n. 4, p. 651-657, 2012.

NASCIMENTO, P.S.; CHAVES, M.S.; SANTOS FILHO, A.S. et al. Produção In Vitro de Embriões Utilizando-se Sêmen Sexado de Touros 5/8 Girolando. **Ciência Animal Brasil**, v. 16, n. 3, p. 358-368, 2015.

O'HARA, L.; HANRAHAN, J.P.; RICHARDSON L.; DONOVAN A.; FAIR S.; EVANS, A.C.O.; LONERGAN, P. Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. **Theriogenology**, v. 73, n. 4, p. 541- 549, 2010.

OKUDA, T.; BAES, A.U.; NISHIJIMA, W. et al. Isolation and Characterization of Coagulant Extracted from *Moringa oleifera* Seed by Salt Solution. **Water Research**, v. 35, p. 405-410, 2001.

PACHECO, A.; QUIRINO, C.R. Comportamento sexual em ovinos. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p. 87-97, 2010.

PAULENZ, H.; SODERQUIST, L. Effect of milk and TRIS-based extenders on the fertility of sheep inseminated vaginally once or twice with liquid semen. **Theriogenology**, v. 60, n. 4, p. 759-766, 2003.

PRAVEENA, R.; SADASIVAM, K.; KUMARESAN, et al., Experimental and DFT studies on the antioxidant activity of a C-glycoside from *Rhynchosia capitata*. **Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 103, p. 442-452, 2013.

PESCH, S.G.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. **Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 597-612, 2006.

PHILLIPS PH, LARDY HA. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. **Journal of Dairy Science**, v. 23, p. 399- 404, 1940.

PRABSATTROO, T.; WATTANATHORN, J.; IAMSA-ARD, S. et al. *Moringa oleifera* leaves extract attenuates male sexual dysfunction. **American Journal of Neuroscience**, n. 2, v. 1, p. 17-24, 2012.

PRODUTOS DE ORIGEM CAPRINA E OVINA: MERCADO E POTENCIALIDADES NA REGIÃO DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO. n. 3. Sobral: **Embrapa Caprinos e Ovinos**, 2018.

PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 215-225, 2006.

QUADROS, D. G . **Produção de ovinos e caprinos de corte**. 1.ed. Eduneb. Salvador : Ferreira da Cruz, p. 297, 2017.

RAMALHO-SANTOS, J.; AMARAL, S. Mitochondria and mammalian reproduction. **Molecular Cellular Endocrinology**, v. 379, n. 1, p. 74-84, 2013.

RIVLIN, J.; MENDEL, J.; RUBINSTEIN, S.; EKTOVITZ, N.; BREITBART, H. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. **Biology Reproduction**, v. 70, p. 518–522., 2004.

ROLDAN, E.R.S. Sperm competition and the evaluation of sperm form and function in mammals. **Reproduction Domestic Animals**, v. 54, n. 4, p. 14-21, 2019.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of Ram Semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 77-111, 2000.

SÁNCHEZ-RUBIO, F.; SORIA-MENESES, P.J.; JURADO-CAMPOS, A. et al. Nanotechnology in re-production: Vitamin E nanoemulsions for reducing oxidative stress in sperm cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 160, p. 47–56 2020.

SANTOS, M.A.M.; GRADELA, A.; MORAES, E.A. et al. Características do sêmen a fresco e descongelado de garanhões da raça Nordestina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 11, p. 925-932, 2015.

SIDDIQ, A.; ANWAR, F.; MANDOOR, M.; FATIMA, A. Antioxant activity of different solvent extracts of Moringa oleífera leaves under accelerates storage of sunflower oil. **Asian journal of plant sciencies**, v. 4, n. 6, p. 630-635, 2005.

SILVA, A.R.; FONTENELE-NETO, J.D.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M.; CHINIRÉA, V.H.; LOPES, M.D. Description of ultrastructural damages in frozen-thawed canine spermatozoa. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, p. 595-601, 2009.

SILVA, E.C.B. **Efeito da ação antioxidante de diferentes crioprotetores e antioxidantes na criopreservação do semen de ovinos da raça santa inês**. 2010. 95 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958-978, 2006.

SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução de crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, p. 370-384, 2011.

SILVA, E.C.B.; ARRUDA, L.C.P.; SILVA, S.V. et al., High resveratrol or quercetin concentrations reduce the oscillation index of frozen goat semen, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, p. 1237-1243, 2016.

SIMÕES, R.; SIQUEIRA, A. F. P.; NICHI, M.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPCÃO, M. E. O. D.; Qualidade da cromatina espermática e sua implicação no desenvolvimento embrionário inicial de bovinos. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 12, n. 3, p. 18 – 35, 2014.

SINGH, P.; SINGH, I.; SINGH, S. et al. Initial stage glycerolization prevents the incidence of backward sperm motility during cryopreservation and increase buffalo semen freezability, **Indian Journal of Animal Science**, v. 76, n. 10, p. 777-779, 2006.

SIQUEIRA, J.B.; GUIMARÃES, J.D.; PINHO, R.O. Relação entre perímetro escrotal e características reprodutivas em bovinos de corte: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n.1, 2013.

SOARES, A.T.; GUERRA, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática. **Tecnologia Ciência Agropecuária**, v. 3, p. 53-63, 2009.

SOARES, F.A.P.; BORBA NETO, A.V.; ARRUDA, L.C.P. et al. Efeito da adição de antioxidantes (Trolox e Glutathione Reduzida) na lipoperoxidação, estresse oxidativo e viabilidade de espermatozoides ovinos submetidos à congelação. In: Jornada de Ensino, Pesquisa e extensão, 10, 2010, Recife; Semana Nacional de Ciência e Tecnologia, 1, 2010, Recife; Semana Estadual de Ciência e Tecnologia, 1, 2010, Recife. **Anais...**, Recife: UFRPE/SBPC, 2010.

SOUZA, W.L.; MORAES, E.A.; TONIOLLI, R. Adição de antioxidantes ao sêmen de carneiros e seus efeitos após a descongelação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 471-478, 2017.

TOURMENTE, M.; ROLDAN, E.R.S.; Mass-Specific Metabolic Rate Influences Sperm Performance through Energy Production in Mammals. **Plos One**, v. 10, n. 9, 2015.

TREJO A, PERALTA M, CASTRO O. Frozen caprine semen in tris-egg yolk-based extenders. In: International Conference on Goat, 4, Brasília, DF, Brazil. **Proceedings...** Brasília: EMBRAPA/DDT, 1987. v. 2, p. 1499-1500.

USTUNER, B.; ALCAY, S.; TOKER, M.B. et al. Effect of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) seminal plasma on the post-thaw quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based or egg yolk based extender. **Animal Reproduction Science**, v. 164, 2015.

VERMA, A.R.; VIJAYAKUMAR, M.; MATHELA, C.S. et al. In Vitro and in vivo antioxidant properties of different fractions of Moringa oleifera leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 9, p. 196-201, 2009.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M., ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1-3, p. 23-53, 2000.

WAHJUNINGSIH, S.; MUHAMMAD, N.I.; GATOT, C.; NURUL, I. et al. Effect of Moringa oleifera leaves extract on post-thawed semen quality of Senduro Goat. **Earth and Environmental Science**, v. 247, 2019.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

XU, Y.B.; CHEN, G.L.; GUO, M.G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the crude extracts of Moringa Oleifera from Kenya and their correlations with flavonoids. **Antioxidants**, v. 8, n. 286, p. 2-12, 2019.

YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 349-355, 2000.

Artigo Científico

Extrato aquoso das folhas de *Moringa oleifera lam* adicionado a diluidores de congelção danifica membranas espermáticas caprina

Desirée Coelho de Mello Seal¹; Millena Maria Monteiro¹; Lúcia Cristina Pereira Arruda¹; Jerônimo Hugo de Souza¹; Robson Raion de Vasconcelos Alves²; Luiz Alberto Lira Soares²; Thiago Henrique Napoleão²; Patrícia Maria Guedes Paiva²; Lucas Eduardo Bezerra de Lima³; Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo³; Maria Madalena Pessoa Guerra¹.

¹Laboratório de Andrologia, Departamento de Reprodução Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, Brasil

²Laboratório de Bioquímica de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil

³ Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular, Departamento de Microbiologia, Instituto Aggeu Magalhaes- Fiocruz, Recife, Brasil

Resumo

Objetivou-se determinar o efeito da suplementação de diferentes concentrações do extrato aquoso de folhas de *Moringa oleifera* (MO) em diluidores de criopreservação dosêmen caprino, sobre os parâmetros de cinética e viabilidade espermática, pós- descongelação. Seis *pools* de sêmen, obtidos de quatro reprodutores caprinos, foram congelados em diluidor à base de leite desnatado (LD) ou Tris-gema de ovo (TGO), suplementados com diferentes concentrações de MO (0, 1, 2 e 5 mg/mL). Após a descongelação, as amostras foram avaliadas quanto aos parâmetros cinéticos, de viabilidade (integridade de membranas plasmática e acrossomal) e ultraestruturas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A suplementação com extrato de MO no diluidor de leite, na concentração de 5mg/mL influenciou nos parâmetros de cinética espermática (WOB e SRT), sendo esses valores obtidos menores ($p < 0.05$) do que os dos grupos controle, grupos LD1 (1 mg/mL) e LD2 (2mg/mL). Observou-se que os grupos LD1 (1 mg/mL), LD2 (2mg/mL) e LD5 (5mg/mL) apresentaram menor ($p < 0.05$) integridade de membrana, quando comparados ao LD (controle). Já a suplementação com extrato de MO no diluidor a base de TGO, o único parâmetro cinético influenciado foi o WOB, sendo os valores de TGO1 (1mg/mL), TGO2 (2mg/mL) e TGO5 (5mg/mL) menores que os valores do grupo controle ($p < 0.05$). De acordo com a avaliação da ultraestrutura espermática por MEV, o extrato de MO, independente do diluidor utilizado, danificou a membrana das células espermáticas de forma dose-dependente. Conclui-se que o extrato aquoso de folhas de MO, em diluidor à base de leite desnatado ou Tris-gema de ovo, nas concentrações 1, 2 e 5 mg/mL, afeta os parâmetros de progressividade espermática (WOB e STR), e prova danos à membrana plasmática, de forma dose-dependente.

Palavras- chave: antioxidante; ROS; extrato natural; tris-gema-de-ovo; leite desnatado.

1 INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen, associada à inseminação artificial, tem sido responsável por grandes avanços na produção pecuária. Portanto, a manutenção da viabilidade espermática é um dos fatores fundamentais para o sucesso do emprego dessas tecnologias (SALMON et al., 2017).

O processo de congelamento por si só já é considerado um entrave à manutenção da qualidade espermática, uma vez que a grande variação de temperatura pode provocar alterações físicas e bioquímicas, tanto em nível de célula espermática quanto de ambiente, como redução da integridade de membrana e da motilidade progressiva dos espermatozoides (SANTOS et al., 2015). Dentre as alterações bioquímicas, a elevada produção das espécies reativas ao oxigênio (ROS) tem sido considerada como um dos principais agentes de comprometimento à qualidade de amostras de sêmen congelado (SOUZA et al., 2017).

Com o intuito de minimizar os danos ocasionados pelas elevadas concentrações de ROS, diversas moléculas com potencial antioxidante têm sido adicionadas aos diluidores para congelamento de sêmen e muitas delas tem se mostrado efetivas em evitar os danos decorrentes do processo de oxidação observados após a criopreservação (SÁNCHEZ-RUBIO et al., 2020). Dentre as classes de antioxidantes, os flavonoides como quercetina e fenóis tem apresentado alto poder antioxidante, quando adicionados ao diluidor de sêmen de caprinos (WAHJUNINGSIG et al., 2019).

Apesar dos efeitos positivos, as moléculas antioxidantes disponíveis comercialmente têm custo elevado e precisam de complexos processos para sua obtenção. Por outro lado, folhas e sementes de plantas são fontes riquíssimas de moléculas conhecidas como antioxidantes naturais, e os extratos (aquoso ou etanólico) dessas plantas podem consistir em potenciais fontes de aditivos antioxidantes de baixo custo (OLIVEIRA et al., 2009)

A *Moringa oleifera* Lam, planta arbórea nativa da Ásia, encontrada em regiões tropicais, é uma hortaliça perene que apresenta baixo custo de produção e boa adaptação a períodos de estiagem (KARADI et al., 2006). Além disso, é conhecida por apresentar grandes quantidades de minerais, vitaminas e proteínas, além de altos teores de antioxidantes, como os ácidos fenólicos e flavonoides, responsáveis por tornar o extrato da folha de moringa uma substância antioxidante bastante relevante (XU; CHEN; GUO, 2019). Khatun et al. (2009) relataram que folhas de *M. oleifera* contêm lectinas, proteínas

capazes de se ligar a carboidratos. Lectinas são capazes de interagir com glicoconjugados presentes em superfícies de diferentes tipos celulares, causando alterações no funcionamento e na morfologia (ALMEIDA et al., 2020; CARNEIRO et al., 2022).

Portanto, o presente estudo investigou o efeito do extrato aquoso das folhas de *Moringa oleifera Lam.*, adicionado aos diluentes à base de leite desnatado ou Tris- gema de ovo, na qualidade de espermatozoides caprinos, pós-congelação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA/UFRPE) com licença 123/2019.

2.1 Reagentes

Todos os reagentes usados neste estudo foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

2.2 Local do experimento

As folhas de *Moringa oleifera* (MO) foram colhidas no campus da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE, Recife, PE, Brasil), com autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (38690), vinculado ao Ministério do Meio Ambiente do Brasil. A preparação e caracterização do extrato aquoso de MO foram realizadas no Laboratório de Bioquímica de Proteínas do Departamento de Bioquímica da UFPE. A congelação do sêmen e as análises pós-descongelação (análise computadorizada da cinética espermática e a microscopia de epifluorescência) foram realizadas no Laboratório de Andrologia da UFRPE. Enquanto a análise da ultraestrutura espermática por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada no Laboratório Aggeu Magalhães (LIKA, Recife, PE, Brasil).

2.3 Preparação do extrato aquoso de *Moringa oleifera Lam*

Inicialmente, as folhas secas de MO foram trituradas e 10 gramas do pó foi misturado com água destilada (100 mL), sob agitação constante (4h a 25 °C). Em seguida, a mistura foi filtrada e centrifugada (9000 g, 15 min, 25 °C). O sobrenadante colhido correspondeu ao extrato aquoso das folhas, o qual foi acondicionado em microtubos e

congelado (-6 °C), sendo descongelado (37 °C) no momento da incorporação ao diluidor de congelamento de sêmen caprino.

2.3.1 Análise fitoquímica do extrato de *Moringa oleifera* Lam.

Para determinação de metabólitos secundários molecular, o extrato aquoso das folhas da MO foi liofilizado e 5 mg foi solubilizado em etanol 50% (v/v). Por fim, foram filtrados para *vials*, utilizando filtros de PVDF (0,45 µm). A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada num sistema de cromatografia líquida de alta performance - HPLC Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, EUA), acoplado a um detector de arranjo de fotodiodo (DAD; Thermo Fisher Scientific) e equipado com bomba binária (HPG-3x00RS, Thermo Fisher Scientific), desgaseificador e amostrador automático equipado com um *loop* de 20 µL (ACC-3000, Thermo Fisher Scientific). O comprimento de onda foi fixado em 270 nm. As separações cromatográficas foram obtidas com uma coluna C18 (250 mm x 4,6 mm d.i., 5 µm; Phenomenex[®]), equipada com pré-coluna (C18 de 4 mm x 3,9 m; Phenomenex[®]). As separações foram efetuadas a temperatura de 25 °C. A fase móvel foi constituída por água ultrapura (A) acidificada com ácido trifluoroacético a 0,05%, e fluxo ajustado a 0,7 mL/min. Um programa de gradiente foi aplicado como segue: 0-5 min, 20-25% de B; 5-10 min, 25-40% de B; 10-20 min, 40-80% de B; 20-25 min, 80-85% de B; 25-30 min, 85-40% de B; 30-32 min, 40-20% de B; 32-34 min, 20% de B. Os dados foram analisados, após a injeção em triplicata, e processados usando o software Chromeleon 6.8 (Dionex/Thermo Fisher Scientific, EUA). O teor foi calculado segundo a equação da reta dos padrões utilizados.

2.3.2. Ensaio de atividade hemaglutinante

Para avaliar a presença de lectinas no extrato, foi realizado o ensaio de atividade hemaglutinante (AH). Foi utilizada uma suspensão 2,5% (v/v) de eritrócitos de coelho tratados com glutaraldeído. Os eritrócitos foram coletados por meio de protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPE (processo 23076.033782/2015-70). No ensaio de AH, a amostra (50 µL) foi diluída serialmente (até 1:2048) em NaCl 0,15 M em microplacas de 96 poços. Em seguida, 50 µL da suspensão de eritrócitos foram adicionados a cada poço. Eritrócitos incubados com NaCl 0,15 M foram usados como controles. Após 45 min, foi observada a ocorrência de hemaglutinação.

2.4 Animais, colheita, avaliação do sêmen fresco e congelação

Foram utilizados quatro reprodutores da raça Saanen, adultos, hípidos, mantidos sob sistema de confinamento na UFRPE e alimentados com feno de capim tifton, ração peletizada comercial (400g/dia) e água *ad libitum*.

Os reprodutores foram previamente aprovados em exame clínico-andrológico e os ejaculados foram colhidos em dias alternados, com auxílio de vagina artificial e de uma fêmea em estro como manequim. Foram obtidos 6 ejaculados de cada reprodutor, totalizando 24 ejaculados.

Imediatamente após a colheita de sêmen foram avaliados a motilidade e o turbilhonamento por meio de microscopia óptica de contraste de fase (Olympus 100 X, Tokyo, Japão). Apenas os ejaculados com turbilhonamento ≥ 3 e motilidade total $\geq 70\%$ foram utilizados para formação de *pool* seminal.

Cada *pool* de amostras de sêmen foi centrifugado (600g por 10 minutos) duas vezes, para retirada do plasma seminal, utilizando o meio Tris tampão (3,605 g Tris; 2,024 g ácido cítrico; 1,488 g frutose, 100 mL de água ultrapura, pH 6,8), conforme descrito por Silva *et al.* (2021). Após a centrifugação, foi realizada a avaliação da concentração espermática utilizando câmara de Neubauer.

Para criopreservação, o *pellet* resultante do processo de centrifugação foi ressuspendido em diluidor à base de leite desnatado (LD: 10 g leite em pó desnatado; 0,0194 g glicose; 100 mL de água ultrapura; 5% glicerol, pH 6,8), que correspondeu ao

experimento I. Para o experimento II, foi utilizado Tris-gema de ovo (TGO: 3,786 g de Tris; 2,172 g de ácido cítrico; 0,625 g de frutose; 20% de gema de ovo; 100 mL de água ultrapura; 5% de glicerol, pH 6,8). Em ambos os experimentos, utilizou-se a concentração final de 200×10^6 espermatozoides/mL. Após diluição, as amostras de sêmen foram suplementadas com diferentes concentrações de extrato aquoso de MO de acordo com o grupo experimental: LD (controle, sem adição de MO), LD1 (1mg/mL), LD2 (2mg/mL) e LD5 (5mg/mL) e TGO (controle, sem adição de MO), TGO1 (1mg/mL), TGO2 (2mg/mL) e TGO5 (5mg/mL).

2.5 Congelamento do sêmen

Após a diluição, as amostras foram envasadas em palhetas (0,25 mL) e congeladas em sistema automatizado de congelamento de sêmen (TK Tecnologia em congelamento LTDA, Uberaba, Brasil), utilizando curva de refrigeração de $-0,25 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, até atingir $5 \text{ }^\circ\text{C}$. Então as amostras permaneceram em estabilização por mais 120 min a $5 \text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida, foi iniciada a curva de congelamento ($-20 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$), até atingir $-120 \text{ }^\circ\text{C}$, quando as palhetas foram imersas e em seguida armazenadas em nitrogênio líquido ($-196 \text{ }^\circ\text{C}$), até a realização das análises.

2.6 Descongelamento e avaliação do sêmen

Para realização das análises, duas palhetas de sêmen de cada grupo experimental foram descongeladas ($37 \text{ }^\circ\text{C}/30 \text{ s}$). Imediatamente após a descongelamento, o conteúdo das palhetas foi agrupado e as amostras foram submetidas às seguintes avaliações:

A avaliação da cinética espermática foi realizada no sistema computadorizado de análise espermática (CASA, SCATM; Microoptics, S.L., Versão 5.1, Barcelona, Espanha). Uma alíquota ($2,5 \text{ } \mu\text{L}$) de cada amostra foi colocada em lâmina pré-aquecida ($37 \text{ }^\circ\text{C}$), coberta com lamínula e avaliada em microscopia de contraste de fase (Eclipse 50i, Nikon, Japão). As imagens foram capturadas usando uma câmera de vídeo (Basler Vision TechnologieTM A312FC, Ahrensburg, Alemanha), com magnificação de 100x. Para cada amostra, cinco campos aleatórios e não consecutivos foram registrados. As seguintes variáveis foram avaliadas: motilidade total (MT; %), motilidade progressiva (MP; %), velocidade curvilínea (VCL; $\mu\text{m}/\text{s}$), velocidade em linha reta (VSL; $\mu\text{m}/\text{s}$) e velocidade média do percurso (VAP; $\mu\text{m}/\text{s}$), linearidade (LIN; %), retilinearidade (STR;

%), wobble (WOB), amplitude lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento de cauda (BCF) e a porcentagem de espermatozoides rápidos (RAP; %).

As variáveis do sistema CASA foram mensuradas usando as seguintes configurações: temperatura (37 °C), ampliação (100x), quadros por segundo (25), área da cabeça (20-70 μm^2), VAP (lento ;10 $\mu\text{m} / \text{s}$, médio <45 $\mu\text{m} / \text{s}$, rápida <75 $\mu\text{m} / \text{s}$), progressividade (80% STR) e linearidade (50% LIN).

As análises de integridade de membrana plasmática (iMP) e integridade de acrossoma (iAC) foram realizadas por meio de microscopia de epifluorescência (x400; Carl Zeiss, Göttingen, Germany). A iMP foi avaliada pelo método de dupla coloração, utilizando os fluorocromos diacetato de carboxifluoresceína (CFDA; 0,46 mg/mL em DMSO) e iodeto de propídio (IP; 0,5 mg/mL em PBS). Para cada tratamento, uma alíquota (30 μL) da amostra foi corada com 5,0 μL de CFDA e 5,0 μL IP, incubada por 10 min (25 °C). Um total de 200 espermatozoides foram avaliados usando filtro de excitação DBP 485/20 nm e filtro de emissão de 580-630 nm. O DCF é um éster não polar que, quando em contato com a célula íntegra, fluoresce de verde. Já o iodeto de propídio penetra na membrana plasmática quando há algum dano e, por sua composição ter afinidade pelo DNA da célula, cora a célula de vermelho (SILVA et al., 2009).

A avaliação da integridade de membrana acrossomal (iAC) foi realizada utilizando o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína conjugado a *Peanut agglutinin* (FITC-PNA; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em PBS). Para cada tratamento, uma alíquota (10 μL) da amostra foi utilizada para confecção de estirado, que, após seco ao ar, foi corado com 20 μL de FITC-PNA e incubado em câmara úmida (4 °C) por 20 minutos, no escuro. Posteriormente, as lâminas foram imersas em TRIS tampão, duas vezes, e secas naturalmente. Imediatamente antes da avaliação, 5,0 μL do meio de montagem (4,5 mL de glicerol, 0,5 mL PBS e 5,0 mg de p-fenilediamine) foram colocados na lâmina e cobertos com lamínula. Ao todo, 200 espermatozoides por lâmina foram avaliados sob imersão, utilizando filtro de emissão LP 515 nm e filtro de excitação BP 450-490 nm. Com a utilização do FITC-PNA, a integridade acrossomal é avaliada segundo a coloração observada em microscopia (Silva e Guerra, 2012). Os espermatozoides com acrossoma íntegro são marcados de uma coloração verde brilhante, já os espermatozoides com acrossoma reagidos, são corados de verde em toda extensão da cabeça (ROTH et al., 1998).

2.7 Microscopia eletrônica de varredura

Para análise ultraestrutural, os espermatozoides das diferentes amostras de sêmen caprino congeladas em diluente à base de leite desnatado (LD, LD1, LD2, LD5) ou Tris-gema de ovo (TGO, TGO1, TGO2 e TGO5) foram lavadas 3 vezes em tampão fosfato salino (PBS; pH 7,2) e fixadas por 2h a 25 °C em solução contendo 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído em tampão cacodilato a 0,1 M (solução de Karnovsky; pH 7,2). Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes em PBS e pós-fixadas por 1h em solução a 1% de tetróxido de ósmio a 0,8%, ferricianeto de potássio a 5 mM e Chacel₂ em 0,1 M de tampão cacodilato, por 30 minutos, no escuro. As células foram lavadas mais 3 vezes em PBS, aderidas com poli-L-lisina em lamínulas, desidratadas gradativamente em solução de etanol (etanol a 7, 15, 30, 50, 70, 90 e 100%), submetidas ao ponto crítico no aparelho HCP-2 Critical Point Dryer (Hitachi, Tokyo, Japan) e metalizadas com uma camada de ouro de, aproximadamente, 20 nm. As imagens foram geradas pelo microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-.5600LV (JEOL, Tokyo, Japan). Foi realizada uma avaliação descritiva das estruturas espermáticas. Na cabeça, o acrossoma e a membrana plasmática foram analisados. Na cauda, foram observadas a peça intermediária e o flagelo.

2.8 Análise estatística

Os grupos experimentais foram testados para a normalidade usando o Teste Shapiro-Wilk. Em seguida, as variáveis paramétricas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) unilateral, seguida do teste de Tukey. As variáveis não-paramétricas foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Os dados foram expressos como média ± DP (desvio padrão) e foram considerados significativos se $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se a versão GraphPad Prism8 (Version 8.0.1).

3 RESULTADOS

Segundo os espectros de varredura (Figura 1), foi possível identificar a presença de derivados flavonoídicos semelhantes à rutina e vitexina, de acordo com a comparação entre o espectro de UV de cada pico e o espectro de UV de padrões utilizados sendo observado: rutina (máximos 250 e 355 nm) e vitexina (máximos 270 e 330 nm). Os teores de rutina e vitexina calculados foram de 0,29 e 0,02 g%, respectivamente. O extrato

não foi capaz de promover a aglutinação de eritrócitos, ou seja, não foi detectada a presença de lectinas.

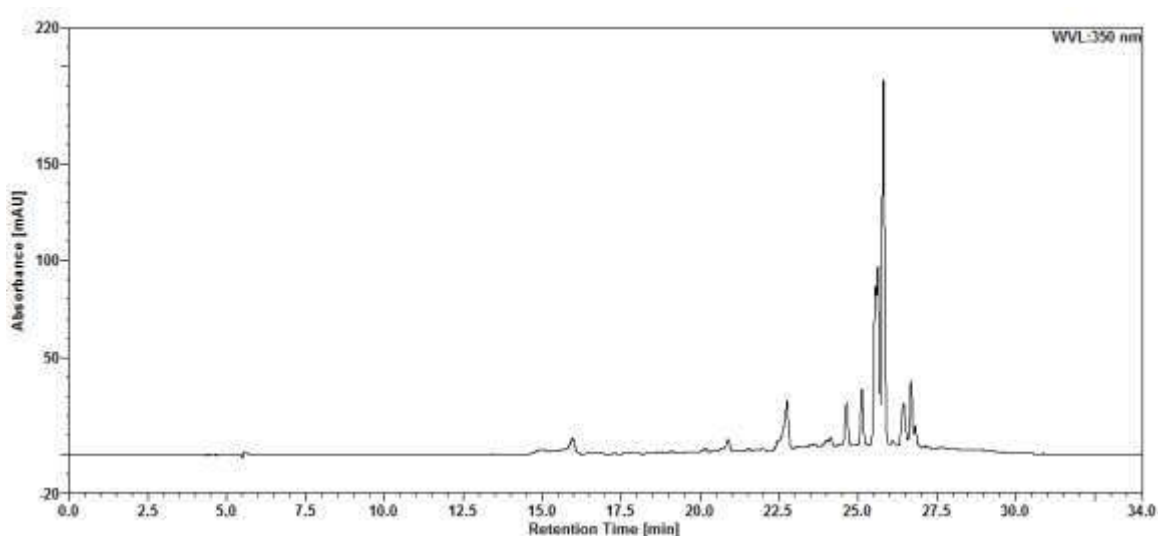


Figura 1: Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência. Fonte: Laboratório de Farmacognosia- UFPE, 2019.

3.1 Experimento 1: Efeito da congelação de sêmen caprino em diluidor à base de leite desnatado suplementado com extrato aquoso de folhas de *M. oleifera* (MO)

3.1.1 Avaliação da cinética e integridade espermática

A suplementação do diluidor à base de leite desnatado com o extrato aquoso de MO não afetou ($p > 0,05$) as variáveis de MT, MP, RAP, VCL, VSL, VAP, LIN, ALH e BCF (Tabela 1) do sêmen caprino congelado e descongelado. No entanto, o grupo LD5 apresentou menores valores ($p < 0,05$) de STR, quando comparado aos grupos LD, LD1 e LD2. O STR do grupo LD2 foi menor que no grupo LD1 ($p < 0,05$). Já na variável WOB, o grupo LD5 foi inferior ($p < 0,05$) aos demais grupos.

Tabela 1. Valores médios dos parâmetros cinéticos de espermatozoides caprinos, após congelamento em diluente à base de leite desnatado, adicionado de diferentes concentrações (1mg/mL, 2mg/mL ou 5mg/mL) de extrato aquoso de folhas de *Moringa oleifera*

| Variáveis | Grupos Experimentais | | | |
|-------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | LD | LD1 | LD2 | LD5 |
| MT (%) | 45.23±7.99 | 47.63±9.62 | 43.30±10.65 | 31.68±7.43 |
| MP (%) | 20.24± 4.83 | 22.55± 5.77 | 18.68± 7.64 | 7.02± 8.03 |
| RAP (%) | 23.45±7.17 | 19.73±9.59 | 18.23±7.32 | 7.03±3.23 |
| VCL (µm/s) | 97.92± 20.92 | 84.33±19.37 | 95.08±22.10 | 91.67±26.61 |
| VSL (µm/s) | 58.88±10.16 | 57.32±13.77 | 49.98±3.28 | 31.28±10.66 |
| VAP (µm/s) | 75.47±14.78 | 68.62±16.98 | 65.75±9.41 | 50.80±7.22 |
| LIN (%) | 61.10±7.97 | 67.88±6.39 | 56.95±15.28 | 38.53±22.74 |
| STR (%) | 78.55±5.93 ^{AB} | 83.62±3.66 ^A | 79.02±8.32 ^B | 61.87±20.61 ^C |
| WOB (%) | 77.50±4.72 ^A | 81.05±4.60 ^A | 71.10±11.60 ^A | 58.37±14.76 ^B |
| ALH (µm/s) | 3.10±0.61 | 2.67±0.35 | 3.53±1.14 | 3.90±1.24 |
| BCF (Hz) | 11.23±1.00 | 10.02±1.01 | 12.27±1.78 | 9.27±3.00 |

LD = Leite desnatado, sem adição de MO; LD1 = Leite desnatado acrescido de 1mg/mL de MO; LD2 = Leite desnatado acrescido de 2mg/mL de MO; LD5 = Leite desnatado acrescido de 5mg/mL de MO. MT: motilidade total; MP: motilidade progressiva; RAP: células rápidas; VCL: velocidade curvilínea; VSL: velocidade em linha reta; VAP: velocidade média do percurso; LIN: linearidade; STR: retilinearidade; WOB: wobble; ALH: amplitude lateral da cabeça; BCF: frequência de batimento de cauda. ^{A,B,C}: Letras distintas na mesma linha demonstram diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

O percentual de espermatozoides com membrana plasmática íntegra foi menor no grupo LD2 e LD5 do que no grupo LD ($p < 0,05$). Não foram observados quaisquer efeitos do extrato aquoso da MO suplementado em diluidor à base de leite desnatado sobre a iAC pós-descongelamento do sêmen caprino ($p > 0,05$).

Tabela 2. Percentuais de espermatozoides caprinos portadores de membrana plasmática (iMP) e membrana acrossomal (iAC) integras, após congelamento em diluente à base de leite desnatado, adicionado de diferentes concentrações (1mg/mL, 2mg/mL ou 5mg/mL) de extrato aquoso de folhas de *Moringa oleifera* e avaliados em microscopia de epifluorescência

| Variáveis | Grupos Experimentais | | | |
|-----------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | LD | LD1 | LD2 | LD5 |
| iMP (%) | 45.00±8.20 ^A | 39.67±12.04 ^{AB} | 27.33±15.79 ^B | 28.67±16.59 ^B |
| iAC (%) | 28.25±4.66 | 28.00±8.77 | 24.25±8.55 | 31.76±8.81 |

LD = Leite desnatado, sem adição de MO; LD1 = Leite desnatado acrescido de 1mg/mL de MO; LD2 = Leite desnatado acrescido de 2mg/mL de MO; LD5 = Leite desnatado acrescido de 5mg/mL de MO. Dados estão expressos em média ± desvio padrão. ^{A,B}: Letras distintas na mesma linha demonstram diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

3.1.2 Avaliação da ultraestrutura por microscopia eletrônica de varredura

A análise de microscopia eletrônica de varredura comprovou por meio de imagens, danos extensos à membrana plasmática, tanto na região da cabeça quanto do colo, dos espermatozoides caprinos congelados em diluidor à base de leite desnatado, suplementado com diferentes concentrações do extrato aquoso das folhas a MO (Figura 2). A análise dos espermatozoides do grupo controle (LD; Figuras 2A e 2B) evidenciou a membrana plasmática intacta, enquanto nas amostras dos grupos tratados (Figuras 2C, 2E e 2G, respectivamente) com diferentes concentrações (1mg/mL, 2mg/mL ou 5mg/mL) de extrato aquoso de folhas de (Figuras 2C, 2D, 2E, 2G e 2H, respectivamente) MO observaram-se danos erosivos na membrana plasmática localizada na cabeça dos espermatozoides e danos localizados na região do colo, em espermatozoides do grupo LD2 (Figura 2F). A ferramenta do MEV foi capaz de auxiliar na confirmação das lesões encontradas em cada grupo experimental, comprovando os danos estatísticos observados

em integridade de membrana plasmática e acrossomal encontradas no presente estudo.

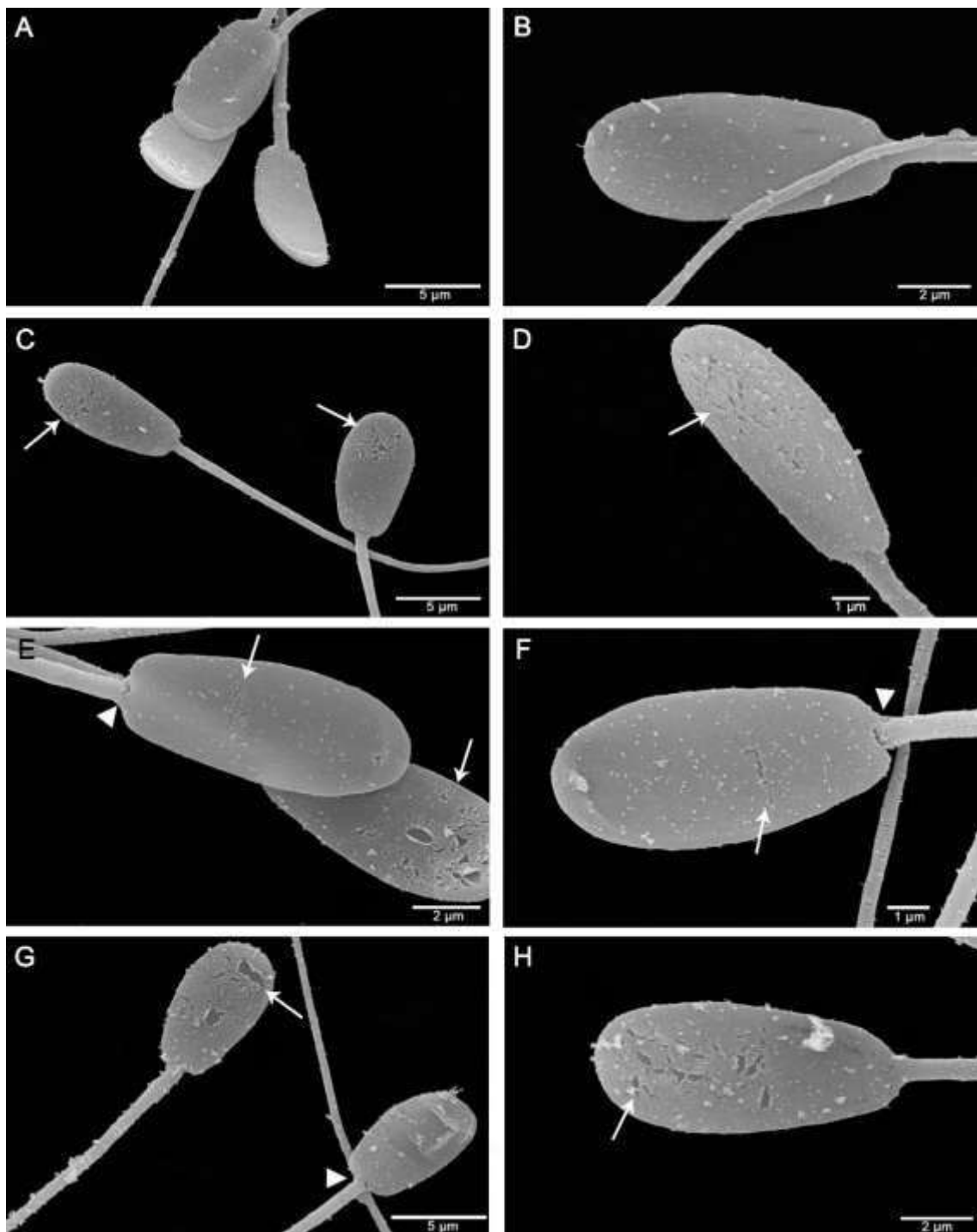


Figura 2. Espermatozoides caprinos, após congelação em diluente à base de Leite Desnatado, adicionado de diferentes concentrações de extrato aquoso de folhas de *Moringa oleifera*, obtidas em microscópio eletrônico de varredura. A e B) grupo controle apresentando membranas plasmáticas íntegras; C) e D) grupo LD1 apresentando lesão na membrana plasmática (seta); E e F) grupo LD2 apresentando perda de integridade de membrana (seta) e alterações na região do colo espermático (cabeça de seta); G e H) grupo LD5 apresentando lesão intensa de membrana espermática (seta) e alterações na região do colo espermático (cabeça de seta).

3.2 Experimento 2: Efeito da congelação de sêmen caprino em diluidor à base de Tris-Gema de ovo suplementado com extrato aquoso de folhas de *Moringa oleifera* (MO)

3.2.1 Avaliação dos parâmetros de cinética e integridade espermática

Os parâmetros de cinética espermática de amostras de sêmen caprino submetidas a congelação utilizando diluidor à base de Tris-Gema de ovo suplementado com MO estão expressos na Tabela 3. A exceção do WOB, as demais variáveis cinéticas não apresentaram diferença ($p > 0,05$) entre os grupos tratados (TGO1, TGO2 e TGO5), em relação ao grupo controle (TGO). Observou-se que o WOB foi menor ($p < 0,05$) no grupo TGO5, em comparação ao grupo TGO (controle). No entanto, não diferiu ($p > 0,05$) dos demais tratamentos (TGO1 e TGO2).

Quanto aos parâmetros de integridade espermática (Tabela 4), avaliados em microscópio de epifluorescência, não foi observado qualquer efeito da suplementação com o extrato aquoso das folhas da MO, ao diluidor TGO, sobre os percentuais de espermatozoides portadores de membranas plasmática (iMP) e acrossomal (iAC) íntegras.

Tabela 3. Valores médios dos parâmetros cinéticos de espermatozoides caprinos, após congelação em diluente à base de Tris-Gema de ovo, adicionado de diferentes concentrações (1mg/mL, 2mg/mL ou 5mg/mL) de extrato aquoso de folhas de *Moringa oleifera*

| Variáveis | Grupos Experimentais | | | |
|------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | TGO | TGO1 | TGO2 | TGO5 |
| MT (%) | 50.43±12.89 | 50.22±11.10 | 49.75±9.960 | 47.38±8.35 |
| MP (%) | 27.99±8.51 | 27.68± 3.43 | 28.37± 7.01 | 20.90±10.35 |
| RAP (%) | 10.96±5.3 | 8.40±5.51 | 15.28±9.21 | 6.33±7.02 |
| VCL (µm/s) | 66.26±9.20 | 64.45± 10.68 | 72.05±10.50 | 71.87±15.43 |
| VSL (µm/s) | 47.97± 6.76 | 43.95±11.21 | 50.87±9.53 | 39.65±8.54 |
| VAP (%) | 55.11±5.09 | 50.72±10.15 | 58.43±9.76 | 49.68±10.47 |
| LIN (%) | 73.70±13.96 | 68.02±9.93 | 70.58±7.37 | 56.43±13.71 |
| STR (%) | 86.97±7.83 | 86.15±5.26 | 86.83±3.80 | 79.93±8.52 |
| WOB (%) | 84.03±9.73 ^A | 78.65±6.78 ^{AB} | 83.18±2.54 ^{AB} | 69.82±10.26 ^B |
| ALH (%) | 1.90±0.57 | 2.25±0.37 | 2.30±0.34 | 2.53±0.6 |
| ALH (%) | 1.90±0.57 | 2.25±0.37 | 2.30±0.34 | 2.53±0.6 |
| BCF (%) | 9.41±0.57 | 10.67±0.70 | 10.48±1.21 | 12.22±2.01 |

TGO = Tris-Gema de ovo, sem adição de *Moringa oleifera*; TGO1 = Tris-Gema de ovo acrescido de 1mg/mL de *Moringa oleifera*; TGO2 = Tris-Gema de ovo acrescido de 2mg/mL de *Moringa oleifera*; TGO5 = Tris-Gema de ovo acrescido de 5mg/mL de *Moringa oleifera*. MT: motilidade total; MP: motilidade progressiva; RAP: células rápidas; VCL: velocidade curvilínea, VSL: velocidade em linha reta; VAP: velocidade média do percurso; LIN: linearidade; STR: retilinearidade; WOB: wobble; ALH: amplitude lateral da cabeça; BCF: frequência de batimento de cauda. ^{A,B}: Letras diferentes na mesma linha demonstram diferença significativa entre os tratamentos (p < 0,05).

Tabela 4. Percentuais de espermatozoides caprinos portadores de membrana plasmática (iMP) e membrana acrossomal (iAC) integras após congelamento em diluente à base de Tris-Gema de ovo, adicionado de diferentes concentrações (1mg/mL, 2mg/mL ou 5mg/mL) de extrato aquoso de folhas de *Moringa oleifera* e avaliados em microscopia de epifluorescência

| Variáveis | Grupos Experimentais | | | |
|-----------|----------------------|-------------|-------------|-------------|
| | TGO | TGO 1 | TGO 2 | TGO 5 |
| iMP (%) | 37.17±4.31 | 45.50±8.22 | 48.58±16.42 | 41.33±14.77 |
| iMA (%) | 23.00±7.64 | 26.93±10.24 | 27.57±7.39 | 26.07±8.78 |

TGO = Tris-Gema de ovo, sem adição de MO; TGO1 = Tris-Gema de ovo acrescido de 1mg/mL de MO; TGO2 = Tris-Gema de ovo acrescido de 2mg/mL de MO; TGO5 = Tris-Gema de ovo acrescido de 5mg/mL de MO. Dados estão expressos em média ± desvio padrão.

^{A,B}: Letras diferentes na mesma linha demonstram diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

3.2.2 Avaliação da ultraestrutura por microscopia eletrônica de varredura

A análise de microscopia eletrônica de varredura evidenciou efeito deletério sobre a membrana plasmática dos espermatozoides caprinos congelados em diluidor à base de Tris-gema de ovo, suplementado com o extrato aquoso das folhas da MO. Foi ainda observado que o efeito deletério dessa suplementação ocorreu de forma dose-dependente.

A análise dos espermatozoides do grupo controle (TGO; Figuras 3A e 3B) evidenciou a membrana plasmática intacta, enquanto nas amostras dos grupos tratados com diferentes concentrações (1mg/mL, 2mg/mL ou 5mg/mL) de extrato aquoso de folhas de (Figuras 3C, 3E e 3G, respectivamente) MO observaram-se danos erosivos na membrana plasmática localizada na cabeça dos espermatozoides e danos localizados na região do colo, em espermatozoides do grupo TGO2 (Figura 3F). Também foi observada célula íntegra no grupo TGO1.

A ferramenta do MEV foi capaz de auxiliar na confirmação das lesões encontradas em cada grupo experimental, comprovando os danos estatísticos observados em integridade de membrana plasmática e acrossomal encontradas no presente estudo.

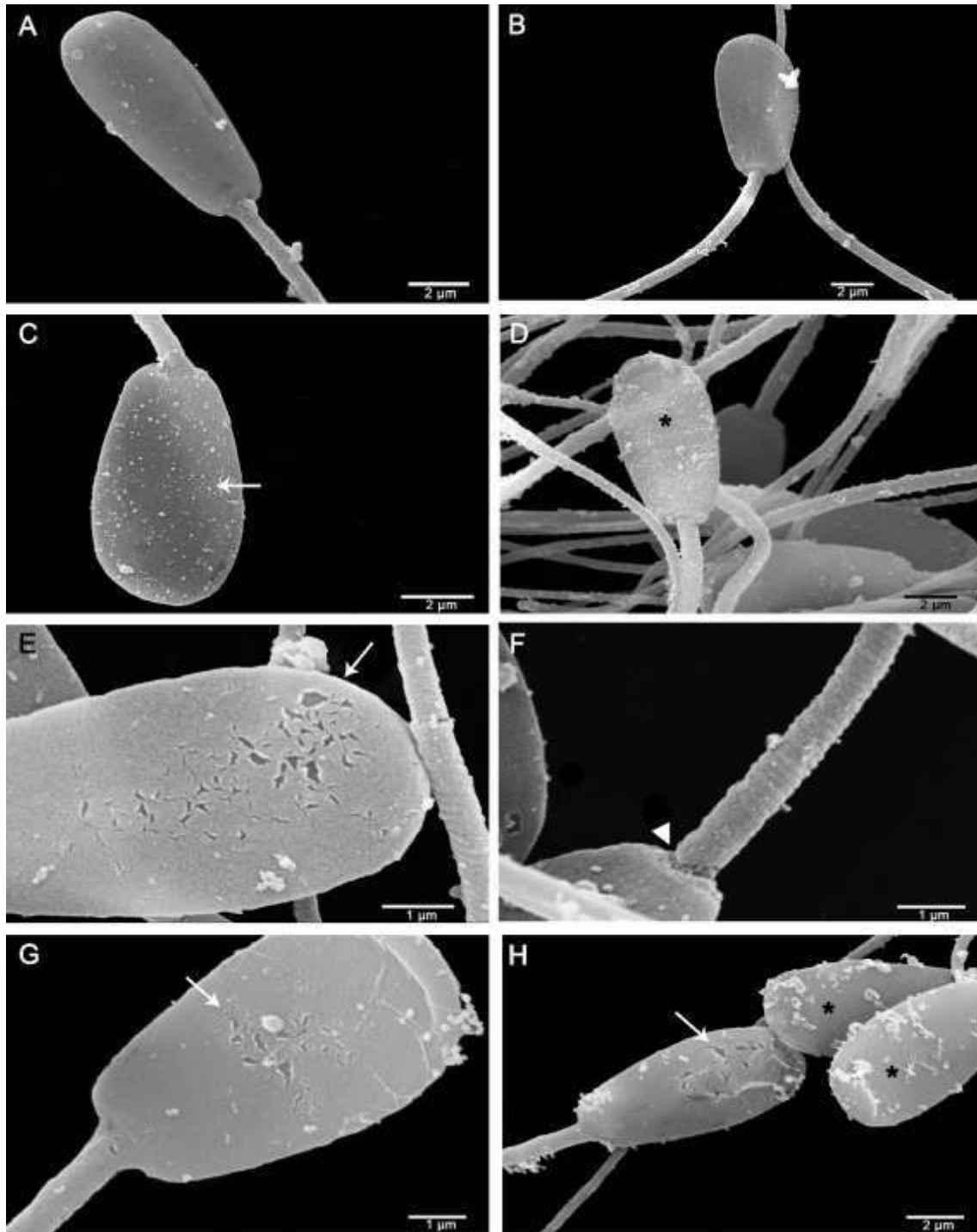


Figura 3. Espermatozoides caprinos, após congelamento em diluente à base de Tris-Gema de ovo, adicionado de diferentes concentrações de extrato aquoso de folhas de *Moringa oleifera*, obtidas em microscópio eletrônico de varredura. A e B) grupo TGO (controle) apresentando membranas plasmáticas íntegras; C) grupo TGO1 apresentando lesão (seta) na membrana plasmática; D) grupo TGO1 apresentando membrana plasmática íntegra (*); E) grupo TGO2 apresentando descamação (seta) da membrana plasmática; F) grupo TGO2 apresentando fragmentação no colo espermático (cabeça de seta); G e H) grupo TGO5 apresentando membranas plasmáticas danificadas (seta) e membrana plasmática íntegra (*).

4 DISCUSSÃO

Neste estudo investigamos o efeito da adição de extrato aquoso da folha de *Moringa oleifera* aos diluidores à base de leite desnatado e Tris-gema de ovo para congelamento de sêmen de caprinos. O extrato utilizado foi caracterizado, onde se observou que em sua composição haviam apenas os compostos flavonoides, rutina e vitexina, considerados potentes agentes antioxidantes (MATA-CAMPUZANO et al., 2012; BABAEI et al., 2020).

A vitexina (apigenina-8-C-glicosídeo) é uma flavona e glicosídeo derivado da apigenina encontrado em alimentos e plantas medicinais. Essa substância apresenta uma variedade de efeitos farmacológicos, incluindo antioxidante (BABAEI et al., 2020). A rutina é um fitoquímico da classe flavonoidal, possuindo um esqueleto básico de 3,4,5,7-tetrahidroxiflurona-3-D-rutinosídeo, sendo amplamente distribuída na natureza em vários vegetais e frutas (YANG et al., 2006). Além disso, a rutina também possui uma variedade de atividades farmacológicas (HORVATH, 2005), incluindo atividade antioxidante (VERBEEK et al., 2004; HUGHES et al., 2008).

Muitas pesquisas têm sido realizadas utilizando diferentes compostos flavonoides adicionados a diluentes de criopreservação de sêmen em diversas espécies e obtiveram resultados variados (MATA-CAMPUZANO et al., 2012; MORETTI et al., 2012; SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2016; ARRUDA et al., 2018; SILVA et al., 2019). No entanto, os trabalhos com vitexina e rutina são escassos.

No presente estudo, a adição do extrato aquoso de MO, contendo exclusivamente rutina e vitexina, aos diluentes de congelamento de sêmen de bode provocaram mudanças no padrão de cinética e de integridade de membrana plasmática dos espermatozoides, após a descongelamento. Observou-se que a adição do extrato aquoso de MO afetou negativamente os parâmetros de STR e WOB no LD (Exp 1) e o WOB no TGO (Exp 2), sendo essa redução dependente da concentração utilizada. Estes achados estão de acordo com estudo realizado por Moretti et al. (2012), que adicionaram diferentes concentrações de rutina ao sêmen humano e observaram redução dose-dependente da progressividade das células espermáticas. Pesquisa realizada por Silva et al. (2016) evidenciou que, ao adicionarem flavonoides (resveratrol e quercetina) ao diluente de congelamento de sêmen de bodes, à base de leite desnatado, observaram redução nos valores de WOB.

Estes efeitos inibitórios sobre o STR e WOB podem impactar sobre a fertilidade dos espermatozoides, já que o WOB é descrito como sendo inversamente proporcional a STR (PERUMAL et al., 2014), parâmetro positivamente correlacionado com a taxa de fertilidade (MATOS et al., 2008). Assim, é possível que a redução desses parâmetros possa estar relacionada ao início de um processo oxidativo das células, já que a atividade antioxidante ou a pró-oxidante de flavonoides dependem de sua estrutura, da concentração e da fonte de radicais livres (KESSLER et al., 2003; BARREIROS et al., 2006; PROCHÁZKOVÁ et al., 2011) e o extrato de MO era composto de dois potentes antioxidantes e os efeitos foram dependentes da dose.

De acordo com Mata-Campuzano et al. (2012), durante a avaliação do estresse oxidativo de sêmen ovino mantido em temperatura ambiente, observou-se que a diminuição da motilidade espermática pode estar mais relacionada à eliminação excessiva de ROS pela rutina do que pelo efeito tóxico direto. Quanto à vitexina, ela age como antioxidante, promovendo a atividade da glutathione peroxidase a qual resulta na diminuição da descarga de ROS (ABDULAI et al., 2021). No entanto, nesta pesquisa, o efeito parece ter sido pró-oxidante, possivelmente devido ao excesso e/ou pela associação com outro potente antioxidante, como a rutina.

Além das alterações na cinética espermática, o extrato de MO provocou danos estruturais na membrana plasmática das células, observada tanto por microscopia de epifluorescência quanto por microscopia eletrônica de varredura. A cinemática (MORTIMER, 2000) e a integridade de membrana plasmática e acrossomal (SILVA e GADELLA, 2006) são essenciais para a fertilidade do espermatozoide, portanto, os danos ocasionados podem comprometer a fertilidade.

A redução no percentual de células com membranas viáveis também foi observada por Mata-Campuzano et al. (2012), após incubarem (37 °C por até 4h) espermatozoides de carneiros, descongelados em meio suplementado com Rutina. O mesmo foi observado por Moretti et al. (2012) ao adicionarem rutina ao sêmen humano. Danos nas membranas plasmáticas de espermatozoides, ocasionados por flavonoides, são frequentemente associadas por diversos autores ao efeito pró-oxidante, dependente da concentração, que desencadeiam a peroxidação lipídica das membranas (WAHJUNINGSIH et al., 2018; EL-KHAWAGAH et al., 2020; RAMCHANDRA et al., 2021). A atividade pró-oxidante do flavonoide está ligada ao total de grupamentos hidroxilas encontradas em uma molécula (CAO et al., 1997).

Não há relatos na literatura sobre a adição de vitexina adicionada ao diluidor de sêmen de qualquer espécie, ou da associação de vitexina e rutina. Desta forma, devido à escassez de estudos anteriores relacionados com as ações desses compostos sobre a função espermática *in vitro*, os resultados dos seus efeitos não são intensamente discutidos.

Apesar de alguns estudos (WAHJUNINGSIH et al., 2019; MOICHELA et al., 2020) terem demonstrado a adição de extratos etanólico /aquoso de MO, respectivamente, em amostras de sêmen, não há caracterização do extrato utilizado nessas pesquisas. Assim, uma vez que a quantidade de antioxidante e outros componentes presentes em cada estrutura da planta, como também o tipo de antioxidante encontrado pode variar de acordo com o ambiente em que esse material foi coletado (XU et al., 2019), os resultados do presente artigo e estudos citados não podem ser comparados entre si.

No trabalho de Wahjuningsih et al. (2019), avaliou-se o efeito do extrato alcoólico da folha de MO na descongelação de sêmen caprino e observou-se um efeito negativo com a suplementação de 7% de MO e os autores relacionaram o fato, possivelmente, à quantidade excessiva de antioxidantes que promoveram um efeito pró-oxidante, resultado semelhante aos encontrados na presente pesquisa.

Quando se trata da suplementação oral com extratos da folha de MO, demonstrou-se que a mesma pode ter um efeito benéfico na performance de ratos, após disfunções sexuais ocasionadas por estresse. Entretanto, não foi possível definir seu real mecanismo de ação (PRABSTTROO et al., 2015). No entanto, segundo Obembe e Raji (2018), o extrato da semente de MO pode ser considerado tóxico para o sistema reprodutor masculino, apresentando efeitos deletérios em andrógenos testiculares, proteína total testicular e variáveis espermáticas, devido à indução do estresse oxidativo.

Lectinas têm sido descritas como capazes de promover alterações na morfologia e funcionamento de diferentes tipos celulares, tais como bactérias, fungos, protozoários, células digestivas de insetos e células cancerosas (LIMA et al., 2017; ARANDA-SOUZA et al., 2018; SILVA et al., 2018, 2019; PATRIOTA et al., 2019). Apesar do relato da presença de lectinas nas folhas de *M. oleifera*, não foram detectadas essas proteínas no extrato aquoso avaliado no presente estudo, o que descarta a possibilidade do envolvimento nas alterações observadas nos espermatozoides.

5 CONCLUSÃO

Conclui-se que a suplementação dos diluidores, à base de leite desnatado ou Tris-gema de ovo, para congelação de sêmen caprino com o extrato aquoso de *M. oleífera*, nas concentrações de 1, 2 e 5 mg/mL, afeta os parâmetros de progressividade espermática (SRT e WOB) e prova danos à membrana plasmática, de forma dose- dependente.

REFERÊNCIAS

ABDULAI, I.L.; KWOFIE, S.K.; GBEWONYO, W.S. et al. Multitargeted Effects of Vitexin and Isovitexin on Diabetes Mellitus and Its Complications. **The Scientific World Journal**, v. 1, n. 1, p. 2-20, 2021.

ALMEIDA, W. A. ; SILVA, T. N. ; NOVA, I. C. V. ; NAPOLEÃO, T. H. ; PONTUAL, E. V. . The Roles of Bacterial Membrane Glycans and Their Importance as Targets of Antimicrobial Lectins. In: Adam C. Toft. (Org.). **Frontiers in Bacteriology Research**. 1ed.New York: Nova Science Publishers, Inc., 2020, v. , p. 197-218.

ARANDA-SOUZA, M.A ; DE LORENA, VIRGINIA, M.B ; DOS SANTOS, C.,M.T ; DE FIGUEIREDO, QUEIROZ, R.M.B . In vitro effect of Bothrops leu urus lectin (BLL) against Leishmania amazonensis and Leishmania braziliensis infection. **International journal of biological macromolecule JCRS**, v. 120, p. 431-439, 2018.

ARRUDA, L.C.P.; ARAÚJO SOLVA, R.A.J.; MONTEIRO, M.M. et al. Avaliação in vitro do sêmen congelado de carneiros com diluidor suplementado com miricetina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 70, n.1, p. 153-159, 2018.

BABAEI, F.; MOAFIZAD, A.; DARVISHVAND, Z. et al. Review of the effects of vitexin in oxidative stress-related diseases. **Food Science & Nutrition**, v. 54, p. 138- 146, 2020.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

CAO, G; SOFIC, E; PRIOR, R.L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 22, n. 5, p. 249-260, 1997.

CARNEIRO, D.C.; FERNANDEZ, L.G.; MONTEIRO-CUNHA, J.P.; BENEVIDES, R.G.; CUNHA LIMA, S.T. A patent review of the antimicrobial applications of lectins: Perspectives on therapy of infectious diseases. **Journal of Applied Microbiology**, 132, 841– 854, 2002

EL-KHAWAGAH, A.M.R.; KANDIEL, M.M.M.; SAMIR, H. Effect of Quercetin Supplementation in extender on sperm Kinematics, Extracellular Enzymes Release, and Oxidative Stress of Egyptian Buffalo Bulls Frozen-Thawed semen. **Frontiers in Veterinary Science**, 2020.

HORVATH C.R; MARTOS, P.A; SAXENA, P.K. Identification and quantification of eight flavones in root and shoot tissues of the medicinal plant huang-qin (*Scutellaria baicalensis* Georgi) using high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1062, p. 199– 207, 2005.

HUGHES, L.A; ARTS, I.C; AMBERGEN, T. et al. Netherlands cohort study. Higher dietary flavone, flavonol, and catechin intakes are associated with less of an increase in BMI over time in women: a longitudinal analysis from the Netherlands cohort study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, p. 1341-1352, 2008.

KARADI, R.V; GADGE, N.B; ALAGAWADI, K.R; SAVADI, R.V. Effect of *Moringa oleifera* Lam. root-wood on ethylene glycol induced urolithiasis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 1-2. 2006.

KESSLER, M; UBEAUD, G; JUNG, L. Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 55, p. 131–42, 2003.

LIMA, T. A. ; FERNANDES, K. M. ; OLIVEIRA, A. P. S. ; DORNELLES, L.

P. ; MARTINS, G.F. ; NAPOLEÃO, T.H. ; PAIVA, P.M.G. . Termiticidal lectins from *Myracrodruon urundeuva* (Anacardiaceae) cause midgut damage when ingested by *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae) workers. **PEST MANAGEMENT SCIENCE**, v. 73, p. 991-998, 2017.

MATA-CAMPUZANO, M.; LVAREZ-RODRIGUEZ, M. A.; LVAREZ, L.A. et al. Effect of Several Antioxidants on Thawed Ram Spermatozoa Submitted to 37 °C up to Four Hours. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 25, p. 145-149, 2012.

MATOS, D.L.; ARAÚJO, A.A.; ROBERTO, I.G. et al. Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literatura (computer-assisted sperm analysis (CASA): a review). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p. 225-232, 2008.

MOICHELA, F.T.; ADEFOLAJU, G.A.; HENKEL, R. Aqueous leaf extract of *Moringa oleifera* reduced intracellular ROS production, DNA fragmentation and acrosome reaction in Human spermatozoa in vitro **Andrologia**, v. 53, n. 1, 2020.

MORETII, E.; MAZZI, L.; TERZUOLI, G. et al. Effect of quercetin, rutin, naringenin and epicatechin on lipid peroxidation induced in human sperm. **Reproductive toxicology**. v.34, p. 651-657, 2012

MORTIMER, S.T. CASA: practical aspects. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 515-524, 2000.

OBEMBE, O.O.; RAJI, Y. Effect of aqueous extract of *Moringa Oleifera* seed on cadmium-induced reproductive toxicity in male Wistar rats. **African Health Science**, v. 18, n. 3, p. 653-663, 2018.

OLIVEIRA, F.R.A. ; OLIVEIRA, F.A. ; GUIMARÃES, I.P. et al . Emergency of seedlings of *Moringa oleifera* Lam irrigated with water of different levels of salinity. **Bioscience. Journal**, v. 25, n. 5. p. 66–74, 2009.

PATRIOTA, L.L.S. ; BRITO, J.S. ; RAMOS, D.B.M. ; PROCÓPIO, T.F. ; PAIVA, P.M.G. ; PONTUAL, E.V. ; MELO, C.M.L. ; NAPOLEÃO, T.H. . Plant-Derived Lectins: A Review of Their Status as Alternatives to Anticancer Chemotherapy. In: Hiroto S. Watanabe. (Org.). Horizons in Cancer Research. 1ed.New York: **Nova Science Publishers, Inc.**, 2019, v. 73, p. 171-205.

PERUMAL, P.; SRIVASTAVA, S.K.; GHOSH, S.K. et al. Computer-assisted sperm analysis of freezable and nonfreezable Mithun (*Bos frontalis*) semen. **Journal of Animal Science**, v. 2014, p. 1-6, 2014.

PRABSATTROO, T.; WATTANATHORN, J.; IAMSAARD, S. et al. *Moringa Oleifera* Extract Enhances Sexual Performance in stressed rats. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 16, n. 3, p. 179-190, 2015.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUSOVA, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 82, p. 513-523, 2011.

RAMACHANDRA, C.J.A; CONG, S; CHAN, X, et al. Oxidative stress in cardiac hypertrophy: From molecular mechanisms to novel therapeutic targets. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 166, p. 297-312, 2021.

SALMON, V.M.; LECLERC,P. ; BAILEY, J.L. Novel technical strategies to optimize cryopreservation of goat semen using cholesterol-loaded cyclodextrin. **Cryobiology**, v. 18, p. 124-129, 2017.

SÁNCHEZ-RUBIO, F.; SORIA-MENESES, P.J.; JURADO-CAMPOS, A. et al. Nanotechnology in re-production: Vitamin E nanoemulsions for reducing oxidative stress in sperm cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 160, p. 47–56 2020.

SANTOS, M.A.M.; GRADELA, A.; MORAES, E.A. et al. Características do sêmen a fresco e descongelado de garanhões da raça nordestina. Morfofisiologia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, p. 84-89, 2015.

SILVA, E.C.B.; ARRUDA, L.C.P.; SILVA, S.V. et al. High resveratrol or quercetin concentrations reduce the oscillation index of frozen goat semen. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 5, p. 1237-1243, 2016.

SILVA, E.C.B.; ARRUDA, L.C.P.; VIEIRA, J.I.T et al. (+) Catechin and (-) epigallocatechin gallate: are these promising antioxidant therapies for frozen goat semen? **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 2, p. 521- 528, 2019.

SILVA, E.C.B.; CAJUEIRO, J.F.P.; SILVA, S.V. et al. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. **Theriogenology**, v. 77, p. 1722-1726, 2012.

SILVA, P.M. ; BALDRY, M. ; PENG, P. ; SILVA, J.N.O. ; SOARES, T.; BRAYNER, F. A. ; ALVES, L.C.; FEITOSA, A.P.S. ; PAIVA, P.M.G. ; INGMER, H. ; NAPOLEÃO, T.H. . Punica granatum sarcotesta lectin (PgTeL) impairs growth, structure, viability, aggregation, and biofilm formation ability of Staphylococcus aureus clinical isolates. **International journal of biological macromolecules**, v. 123, p. 600-608, 2019.

SILVA, P.M. ; MOURA, M.C. ; GOMES, F.S. ; TRENTIN, D.S. ; OLIVEIRA, A.P.S. ; MELLO, G.S.V. ; PITTA, M.G.R. ; REGO, M.J.B.M. ; COELHO, L.C.B.B. ; MACEDO, A.J. ; FIGUEIREDO, R.C.B.Q. ; PAIVA, P.M.G. ; NAPOLEÃO, T. H. . PgTeL, the lectin found in Punica granatum juice, is an antifungal agent against Candida albicans and Candida krusei. **International journal of biological macromolecules JCR**, v. 108, p. 391-400, 2018.

SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells.

Theriogenology, v. 65, p. 958-978, 2006.

SOUZA, W.L.; MORAES, E.A.; TONIOLLI, R. Adição de antioxidantes ao sêmen de carneiros e seus efeitos após a descongelação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 05, 2017.

VERBEEK, R.; PLOMP, A.C.; VAN TOL, E.A; VAN NOORT, J.M. The flavones luteolin and apigenin inhibit in vitro antigen-specific proliferation and interferon- gamma production by murine and human autoimmune T cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, p. 621- 629, 2004.

WAHJUNINGSIH, S.; MUHAMMAD, N.I.; GATOT, C.; NURUL, I. et al. Effect of Moringa oleifera leaves extract on post-thawed semen quality of Senduro Goat. **Earth and Environmental Science**, v. 247, 2019.

XU, Y.B.; CHEN, G.L.; GUO, M.Q. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of the Crude Extracts of Moringa oleifera from Kenya and Their Correlations with Flavonoids. **Antioxidants**, v. 8, p. 296. 2019.

YANG, J.; GUOA, J.; YUAN, J. In vitro antioxidant properties of rutin. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 41, p. 1060–1066, 2000

