

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI

MARCOS ANTÔNIO CELESTINO DE SOUSA FILHO

**EFEITO DA ADIÇÃO DO EXTRATO DE JAMBOLÃO (*Syzygium cumini*) E DO
ÁCIDO PALMÍTICO AO DILUIDOR TRIS-GEMA NA CRIOPRESERVAÇÃO DE
SÊMEN OVINO**

TERESINA, PI
2023

MARCOS ANTÔNIO CELESTINO DE SOUSA FILHO

EFEITO DA ADIÇÃO DO JAMBOLÃO (*Syzygium cumini*) E DO ÁCIDO PALMÍTICO AO DILUIDOR TRIS-GEMA NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN OVINO

Qualificação de Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia Tropical da Universidade Federal do Piauí para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Área de Concentração:
Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Antônio de Sousa Junior

TERESINA, PI
2023

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial CCA
Serviço de Representação da Informação

S725e Sousa Filho, Marcos Antônio Celestino de.
Efeito da adição do jambolão (*syzygium cumini*) e do ácido palmítico ao diluidor tris-gema na criopreservação de sêmen ovino / Marcos Antônio Celestino de Sousa Filho. -- 2023.
68 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - Teresina, 2023.

“Orientador: Prof. Dr. Antônio de Sousa Junior.”

1. Sêmen - ovino. 2. Criopreservação. 3. Ácido palmítico. 4. Jambolão. I. Sousa Junior, Antonio. II. Título.

CDD 636.082 4

Bibliotecário: Rafael Gomes de Sousa - CRB3/1163

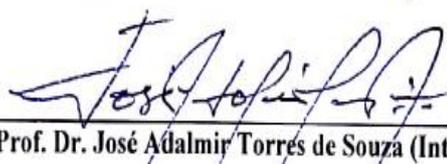
EFEITO DA ADIÇÃO DO EXTRATO DE JAMBOLÃO (SYZYGIUM CUMINI)
E DO ÁCIDO PALMÍTICO AO DILUIDOR TRIS-GEMA NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN OVINO

MARCOS ANTÔNIO CELESTINO DE SOUSA FILHO

Tese aprovada em: 16/06/2023

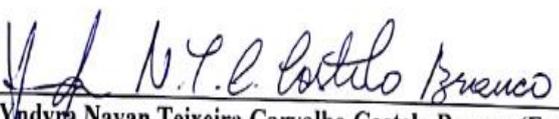
Banca Examinadora:


Prof. Dr. Antonio de Sousa Junior (Presidente) / CTT/UFPI


Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza (Interno) / DCCV /UFPI


Prof. Dra. Isolda Marcia Rocha do Nascimento / (Interna) / CTT/UFPI


Prof. Dr. Mauricio Barbosa Salviano (Externo) / UNIFSA


Prof. Dra. Yndira Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco (Externa) / UFMA

DEDICATÓRIA

À minha família, meus pais Marcos Celestino e Maria Diana, à minha esposa Jessica Feijó ao meu filho Mateus Celestino, às minhas irmãs Marília e Gabriela.

Vocês são minha base.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que em todas as circunstâncias me guia e ilumina para agir racionalmente com ética e bom-senso, controlando cada passo, dando força, perseverança, sabedoria para que eu possa enfrentar os desafios da vida.

Agradeço a minha mãe, Maria Diana Rosa Rabêlo Medeiros de Sousa; ao meu pai, Marcos Antônio Celestino de Sousa; às minhas irmãs Marília Medeiros Celestino de Sousa e Gabriela Medeiros Celestino de Sousa por estarem sempre ao meu lado. À minha família.

Agradecimento especial a minha esposa Jessica Facundes Feijó por estar comigo, pessoa amiga, amorosa, carinhosa e paciente. Obrigado por todo o apoio.

Ao meu filho Mateus Celestino Feijó por tamanha simpatia que alegra meus dias.

À Universidade Federal do Piauí, por me disponibilizar instrumentos e corpo docente qualificado, equipamentos, laboratórios e ambiente de estudo, equipamentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia Tropical pelo suporte prestado durante a realização do doutorado.

À CAPES por disponibilizar recursos financeiros, bolsa de fomento, durante o período da realização da Pós-graduação.

Agradecimento especial ao meu orientador, professor Dr. Antônio de Sousa Junior, que me acolheu entre seus orientados.

Ao professor Dr. José Adalmir Torres de Souza por todo o apoio e suporte científico/intelectual e laboratorial.

Aos pós-graduandos com os quais convivi diariamente nessa caminhada, amigos residentes, mestrandos e doutorandos, obrigado.

Aos colaboradores do Colégio Técnico de Teresina, que ajudaram em várias etapas do projeto.

À Universidade Estadual do Ceará (UECE), pelo suporte de infraestrutura para a análise do CASA.

E a todos, que de alguma forma contribuíram para esse sonho.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Ovinocultura.....	15
2.2 Células Espermáticas e bioquímica seminal ovina.....	16
2.3 Criopreservação de Sêmen.....	19
2.4 Estresse Oxidativo	23
2.5 Antioxidantes	25
2.6 Jambolão	27
2.7 Ácido Palmítico.....	29
2.8 Análises Espermáticas	30
CAPÍTULO I*	34
CAPÍTULO II*	45
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

LISTA DE TABELAS

Capítulo I		Pág.
Tabela 1	Motilidade total (%) e vigor de espermatozoides ovinos criopreservados em diluidor Tris-gema suplementado com Ácido Palmítico 100 μ M e 200 μ M, avaliados pelo TTR.	40
Tabela 2	Integridade da membrana plasmática (IMP), atividade mitocondrial (AM) pós-criopreservação de espermatozoides ovinos, criopreservados em meio suplementado com Ácido Palmítico 100 μ M (T1) e 200 μ M (T2).	41
Tabela 3	Parâmetros da cinética espermática pelo CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) de espermatozoides ovinos criopreservados após suplementação em diferentes concentrações de ácido palmítico no diluidor Tris-gema.	42
Capítulo II		Pág.
Tabela 1	Motilidade total (%) e vigor de espermatozoides ovinos, criopreservados em diluidor Tris-gema, com e sem suplementação, avaliados pelo teste de termo resistência (TTR).	52
Tabela 2	Integridade da membrana plasmática (IMP), atividade mitocondrial (AM) pós-descongelamento de espermatozoides ovinos, criopreservados em diluidor Tris-gema, com e sem suplementação	53
Tabela 3	Parâmetros da cinética espermática pelo CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) de espermatozoides ovinos criopreservados após suplementação em diferentes concentrações de ácido palmítico no diluidor Tris-Gema.	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μL – Microlitro

μM - Micromol

ALH – Amplitude Lateral da Cabeça

BCF – Batimento flagelar cruzado

CASA – Computer Assisted Sperm Analysis (Análise computadorizada de espermatozoides)

DCF – Diacetato de carboxifluoresceína

DMSO – Dimetilsulfóxido

FITC-PNA – Isotiocianato de Fluoresceína Conjugada a *Peanut agglutinin*

g - grama

HOST - Hypoosmotic Swelling Test (Teste Hiposmótico)

IP – Iodeto de propídio

JC-1 – Iodeto de tetraetilbenzimidazolil carbocianina

LIN – Linearidade

mg - Miligrama

mL – Mililitro

mm - Milímetro

mOsm/L – Miliosmol/litro

nm - nanômetro

STR - Retilinearidade

TTR – Teste de Termorresistência

UI – Unidade Internacional

VAP – Velocidade de trajeto

VCL – Velocidade curvilínea

VSL – Velocidade progressiva

ROS – Espécies reativas de oxigênio

RESUMO

A preservação das características espermáticas durante a criopreservação é essencial, porém essa técnica ainda causa bastante efeitos deletérios às células. Objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação de ácido palmítico (AP) em duas concentrações (100 μ M e 200 μ M), do extrato de jambolão (J-0,1mol) e da combinação dos dois antioxidantes em um diluidor para criopreservação de espermatozoides ovinos, na qualidade seminal. Seis carneiros da raça Dorper foram utilizados, sendo coletadas seis amostras por animal com o auxílio de uma fêmea em estro, utilizando uma vagina artificial. Após a avaliação imediata positiva dos ejaculados, foi feito o pool destes, diluído em TRIS-Gema e dividido em dois experimentos. O experimento I abordou três grupos: Controle, T1 (AP-100 μ M), T2 (AP-200 μ M). O segundo experimento abordou os grupos: Controle, T1 (AP-100 μ M + J-0,1mol), T2 (AP-200 μ M + J-0,1mol) e T3 (J-0,1mol). As amostras foram envasadas em palhetas de 0,25ml e criopreservadas com uso da máquina TK 3000®. Após 15 dias de armazenamento em botijão criogênico foram realizadas as análises pós-criopreservação, incluindo o teste de termorresistência (TTR), integridade da membrana plasmática, funcionalidade da mitocôndria e cinética espermática pelo sistema de análise computadorizada de sêmen (CASA). O teste de Shapiro – Wilk foi realizado para verificar se os dados seguiram distribuição normal. A Análise de Variância (ANOVA) e o teste não paramétrico H de Kruskal-Wallis foram utilizados para verificar diferenças entre as médias dos grupos, enquanto que o teste não paramétrico de Wilcoxon foi utilizado para comparar as médias antes e após a congelação. O teste não-paramétrico de Friedman foi utilizado para verificar diferenças entre os tempos e o post-hoc foi aplicado para verificar diferenças em pares. Os dados foram digitados no Excel e analisados no programa IBM Statistical Package for the Social Sciences versão 20.0, adotando-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Durante a análise da integridade da membrana plasmática no experimento I, observou-se um resultado significativo no T1 e T2 em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). No experimento II não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos e o grupo controle nas análises feitas. Conclui-se que a adição do ácido palmítico ao diluidor Tris-gema na concentração de 100 μ M e 200 μ M é capaz de preservar a integridade da membrana plasmática e a cinética espermática durante o processo de criopreservação do sêmen ovino. A adição de 0,1mol de extrato de jambolão e a associação ao ácido palmítico no Tris-gema não apresentou efeitos significativos na qualidade pós-criopreservação do sêmen ovino.

Palavras-chave: sêmen, criopreservação, antioxidantes, ácido palmítico, jambolão, ovinos.

ABSTRACT

Preservation of sperm characteristics during cryopreservation is essential, however, this technique still causes significant deleterious effects on the cells. The objective of this study was to evaluate the effects of supplementation with palmitic acid (PA) at two concentrations (100 μ M and 200 μ M), jambolan extract (J-0.1mol), and the combination of both antioxidants in a diluent for cryopreservation of ovine sperm on seminal quality. Six Dorper rams were used, with six samples collected per animal using an artificial vagina with the assistance of an estrus female. After immediate positive evaluation of the ejaculates, a pool was made, diluted in Tris-egg yolk, and divided into two experiments. Experiment I included three groups: Control, T1 (PA-100 μ M), T2 (PA-200 μ M). The second experiment included the following groups: Control, T1 (PA-100 μ M + J-0.1mol), T2 (PA-200 μ M + J-0.1mol), and T3 (J-0.1mol). The samples were packaged in 0.25ml straws and cryopreserved using the TK 3000® machine. After 15 days of storage in a cryogenic tank, post-cryopreservation analyses were performed, including thermoresistance test (TTR), plasma membrane integrity, mitochondrial functionality, and sperm kinetics using the computer-assisted sperm analysis (CASA) system. The Shapiro-Wilk test was performed to verify whether the data followed a normal distribution. Analysis of variance (ANOVA) and the non-parametric Kruskal-Wallis H test were used to determine differences between the group means, while the non-parametric Wilcoxon test was used to compare means before and after freezing. The non-parametric Friedman test was used to determine differences between times, and post-hoc analysis was applied to determine pairwise differences. The data were entered into Excel and analyzed using IBM Statistical Package for the Social Sciences version 20.0, adopting a significance level of 5% ($p < 0.05$). In the analysis of plasma membrane integrity in Experiment I, a significant result was observed in T1 and T2 compared to the control group ($p < 0.05$). In Experiment II, no significant differences were observed between the treatments and the control group in the performed analyses. In conclusion, the addition of palmitic acid to the Tris-egg yolk diluent at concentrations of 100 μ M and 200 μ M is capable of preserving plasma membrane integrity and sperm kinetics during the cryopreservation process of ovine semen. The addition of 0.1mol of jambolan extract and its association with palmitic acid in Tris-egg yolk did not show significant effects on the post-cryopreservation quality of ovine semen.

Keywords: semen, cryopreservation, antioxidants, palmitic acid, jambolan, sheep.

1. INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen ovino é uma técnica amplamente utilizada em programas de melhoramento genético e conservação de recursos genéticos. No entanto, a taxa de sobrevivência dos espermatozoides após descongelamento pode ser reduzida devido ao excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS

) e estresse oxidativo, o que pode levar à perda da qualidade espermática. A utilização de antioxidantes tem sido considerada uma abordagem promissora para melhorar a qualidade espermática durante o processo de criopreservação. (HOLT, 2000)

O processo de criopreservação é responsável por danificar as células espermáticas, provocando a redução da capacidade funcional dos espermatozoides, diminuição da capacidade de fertilização e morte celular (WATSON, 2000). Os espermatozoides são vulneráveis à peroxidação lipídica, causada pelas ROS, devido ao seu alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados na membrana e à baixa capacidade antioxidante citoplasmática (DARBANDI et al., 2019).

Antioxidantes são agentes capazes de reduzir o estresse oxidativo, tornando-se estratégias efetivas para minimizar os efeitos negativos da criopreservação de sêmen ovino. Estudos verificaram a presença de uma ampla gama de antioxidantes no plasma seminal que podem proteger o espermatozoide contra os efeitos prejudiciais de ROS (SALEH, 2002). Os antioxidantes enzimáticos presentes no plasma seminal incluem superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx), enquanto os antioxidantes não enzimáticos incluem vitaminas A e C, carnitina, glutatona (GSH) e piruvato (RA SALEH, 2002). Entre os antioxidantes utilizados, o extrato de jambolão e o ácido palmítico têm sido objeto de estudos recentes em experimentos com espermatozoides.

O Jambolão é classificado cientificamente como *Syzygium cumini*, no entanto, é conhecido popularmente como azeitona roxa (RUFINO, 2010). Tem suas origens na Índia. (DONADIO, 2007). O mesocarpo do jambolão apresenta efeitos antioxidantes, que são substâncias com capacidade para evitar ou retardar a oxidação dos lipídeos, proteínas, DNA e proteger os compostos ou os tecidos de danos provocados por radicais livres (JAGETIA; SHETTY; VIDYASAGAR, 2012).

O Ácido Palmítico, também tem sido reportado como substância de caráter antioxidativo. Scott e Dawson (1968), verificaram que o Ácido Palmítico e Mirístico

dentro dos fosfolípidos podem ser oxidados para produção de energia. Além disso, estudos de sugerem que o ácido palmítico, combinado com outros crioprotetores, criopreservação de espermatozoides de javali (ZENDONG ZUH, et al., 2020). No entanto, ainda não existem evidências e estudos relativos a atividade antioxidante do Ácido Palmítico na criopreservação espermática de ovinos.

Para melhorar a qualidade pós-descongelamento seminal, é importante a ampliação dos conhecimentos relacionados aos procedimentos de criopreservação do sêmen, associada a estudos que evidenciem o grau de estresse oxidativo de amostras de sêmen desses reprodutores, pós- criopreservação, com a finalidade de aumentar a capacidade fertilizante dessas células.

Objetivou-se, por meio deste estudo, avaliar o efeito da suplementação do extrato de jambolão e do ácido palmítico no diluidor Tris-gema sobre a qualidade do sêmen ovino pós-criopreservação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ovinocultura

Os ovinos foram uma das primeiras espécies de animais domesticadas pelo homem. A sua criação possibilitava alimento, principalmente pelo consumo da carne e do leite, e proteção, pelo uso da lã, fibra que servia como abrigo contra as intempéries do ambiente. A ovinocultura está presente em praticamente todos os continentes, a ampla difusão da espécie se deve principalmente a seu poder de adaptação a diferentes climas, relevos e vegetações (VIANA, 2008).

Nos últimos anos, o agronegócio brasileiro tem apresentado um crescimento expressivo, com destaque para a produção de ovinos. A ovinocultura é uma atividade de grande importância econômica e social em todo o Brasil, em especial na região Nordeste. De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil possui cerca de 20 milhões de ovinos, sendo que a região Nordeste possui 56% do rebanho ovino do Brasil, enquanto a região Sul possui 32% e a região Sudeste é responsável por apenas 9% do rebanho. (IBGE, 2021).

A criação de ovinos no Nordeste é especialmente importante para a sustentabilidade econômica e social de pequenas comunidades rurais. Essa atividade é uma das principais fontes de renda e subsistência para muitas famílias, além de contribuir para a fixação do homem no campo e para a preservação da cultura e tradições regionais (RODRIGUES et al., 2019).

No entanto, a ovinocultura no Brasil e Nordeste ainda enfrenta muitas dificuldades e desafios. Um dos principais problemas é a baixa produtividade dos rebanhos, que muitas vezes são compostos por animais de baixa qualidade genética e manejo inadequado (RODRIGUES et al., 2019).

Além disso, a falta de investimentos em pesquisa e tecnologia, bem como a escassez de mão de obra qualificada, são fatores que limitam o desenvolvimento da ovinocultura no Nordeste (SILVA et al., 2020).

Apesar desses desafios, a ovinocultura ainda apresenta grande potencial de desenvolvimento no Brasil e no Nordeste, especialmente com a adoção de tecnologias modernas de manejo, melhoramento genético e nutrição dos animais. Além disso, a demanda crescente por carne ovina e produtos derivados abre oportunidades para o mercado, especialmente no mercado interno (SILVA et al.,

2020). Para que ocorra esse crescimento produtivo se destaca a importância da utilização de técnicas reprodutivas como, por exemplo, criopreservação de semen, inseminação artificial, transferência de embrião e produção *in vitro* de embriões (FIGUEIREDO, 2008).

2.2 Célula espermática e bioquímica seminal ovina

A espermatogênese é um processo complexo que ocorre nos túbulos seminíferos dos testículos, envolvendo a divisão e transformação de células germinativas em espermatozoides altamente especializados (CHENOWETH et al., 2014). Durante a espermatogênese, ocorre uma polarização acentuada dessas células, que perdem a capacidade de biossíntese, reparo, crescimento e divisão celular em seus estágios finais. Essa especialização é fundamental para que os espermatozoides possam fertilizar os ovócitos e dar origem a zigotos (ALBERTS et al., 2010).

As alterações morfológicas que ocorrem durante a diferenciação das espermátides (espermioogênese), como a formação do acrossoma e do flagelo, modelagem nuclear e condensação da cromatina, ocorrem após a meiose, que é um processo de divisão celular que reduz à metade o número de cromossomos nas células germinativas (YADAY et al., 2013).

Os espermatozoides apresentam uma morfologia complexa, dividida em três partes: cabeça, peça intermediária e cauda (flagelo). A cabeça contém o núcleo, o acrossoma e um conjunto reduzido de elementos citoplasmáticos, que são divididos em segmentos acrossomal, pós-acrossômico e equatorial. A cauda, por sua vez, é dividida em peça intermediária, principal e final. Essa estrutura altamente especializada é fundamental para que os espermatozoides possam cumprir sua função reprodutiva de fertilizar os ovócitos e gerar a descendência (VARNER et al., 2015)

O flagelo é uma estrutura complexa formada por elementos estruturais como o axonema, as mitocôndrias, as fibras densas e a bainha fibrosa, organizados de maneira helicoidal. O axonema, composto por um par central de microtúbulos circundado por outros nove periféricos, é conectado por braços de dineínas, os quais geram o movimento do flagelo (VARNER et al., 2007).

A cromatina, composta de DNA envolvido em proteínas histonas, é

altamente compactada graças às protaminas espermáticas, que promovem a eficiente proteção do DNA (SILVA, 2017). Durante a espermiogênese, ocorre a formação de todas as estruturas necessárias para as funções espermáticas, os espermatozoides são liberados nos túbulos seminíferos e se dirigem ao epidídimo, onde ocorre a maturação final e aquisição da capacidade de motilidade espermática (YADAY et al., 2014).

As mitocôndrias localizam-se na peça intermediária do espermatozoide e são as principais responsáveis pela produção de energia, que é obtida por meio da metabolização da glicose (BRITO et al., 2007).

A membrana plasmática do espermatozoide é uma estrutura importante e altamente sensível a modificações durante o processo de criopreservação. Sua integridade é fundamental para a fertilidade, pois ela protege a célula espermática e mantém a diferença entre o citosol e o ambiente extracelular (BORGES, 2011).

A membrana é composta principalmente de proteínas e lipídios, como fosfolipídios, colesterol, glicolipídios e carboidratos (CELEGHINI, 2005). É uma estrutura seletivamente permeável aos solutos polares, com cerca de 7,5 a 10 nm de espessura e constituída por camadas lipídicas e proteicas unidas por ligações não covalentes, permitindo a livre movimentação lateral das moléculas individuais de lipídios e proteínas no plano da membrana. As proporções relativas desses componentes podem variar entre diferentes tipos de membranas (SILVA, 2017).

A membrana desempenha uma função crucial na preservação da capacidade fertilizante do espermatozoide, por manter a homeostase e o equilíbrio osmótico, agindo como uma barreira entre o meio intracelular e extracelular. A ruptura da integridade da membrana pode provocar a perda de homeostase e resultar em morte celular (ALBERTS et al., 2010).

Quando os fosfolipídios são submetidos a uma redução de temperatura, assumem uma forma cônica, com as extremidades hidrofóbicas voltadas para o exterior e as hidrofílicas para o interior, formando a estrutura hexagonal II ou micela invertida. Durante a transição da membrana da fase fluida para a fase cristalina, as micelas presentes nos fosfolipídios são invertidas, contudo, em certos fosfolipídios, essa estrutura persiste, resultando em aumento da permeabilidade da membrana e na formação de canais que permitem a entrada de íons e pequenas moléculas, podendo desestabilizar a membrana e causar danos irreparáveis (KHOSROWBEYGI et al., 2007).

A fluidez da membrana é determinada pela proporção de colesterol:fosfolipídios, natureza dos fosfolipídios e temperatura. A resistência ao choque frio é maior nas espécies em que a proporção de colesterol:fosfolipídios na membrana plasmática é alta. O colesterol preenche os espaços entre as cadeias de ácidos graxos dos fosfolipídios, estabilizando a membrana, enquanto os glicolipídios localizam-se na superfície da membrana e são responsáveis pela transição das fases de congelação e descongelação (PINHO et al., 2016).

A manutenção da integridade da membrana do espermatozoide é fundamental para o seu potencial de fecundação. Vários testes são utilizados para avaliar a integridade da membrana plasmática, incluindo a eosina-nigrosina, o teste hiposmótico e o uso de sondas fluorescentes, como o diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), o iodeto de propídio (IP), o SYBR-14 e o PNA (NETO et al., 2010).

O plasma seminal é uma secreção complexa de íons inorgânicos, açúcares, sais orgânicos, lipídios, enzimas, prostaglandinas, proteínas e diversos outros fatores produzidos pelos testículos, epidídimo e glândulas sexuais acessórias, como próstata, glândula vesicular, ampola e glândulas bulbouretrais, no macho de mamíferos (DRUART et al., 2013). Plasma seminal (PS) desempenha um papel importante na maturação final dos espermatozoides por meio de eventos hormonais, enzimáticos e modificadores de superfície, e funciona como veículo para espermatozoides ejaculados. Essa mistura complexa varia entre as espécies, bem como entre os machos dentro da mesma espécie, e contém uma variedade de componentes bioquímicos. Os componentes orgânicos do PS são essenciais para manter o metabolismo do esperma, pH e osmolaridade, e as proteínas são os contribuintes mais importantes para a função espermática em mamíferos (MUIÑO-BLANCO; PÉREZ-PÉ; CEBRIÁN-PÉREZ, 2008).

Assim como todas as células biológicas, o metabolismo espermático é dependente de substratos exógenos (como glicose e frutose), os quais são transportados para o interior das células de forma direcionada e exclusiva. Ao contrário de outras células, as células espermáticas não apresentam enzimas para a via das pentoses nem para o metabolismo do glicogênio. A captação de substratos exógenos é realizada por meio de receptores de membrana distribuídos em toda a superfície espermática (VASCONCELOS, 2009).

Os espermatozoides são células com capacidade biossintética limitada, o

que torna a sua funcionalidade controlada principalmente por fatores externos que atuam na superfície celular e nos componentes da membrana plasmática. Quando deixam o testículo, os espermatozoides de mamíferos não possuem capacidade de se ligar à zona pelúcida e fertilizar o óvulo. Para adquirir progressivamente motilidade e habilidade de fertilização, são necessários processos de maturação epididimária e capacitação, que ocorrem durante o trânsito epididimal e no trato reprodutivo feminino, respectivamente (MUIÑO-BLANCO; PÉREZ-PÉ; CEBRIÁN-PÉREZ, 2008).

A produção de espermatozoides em ovinos é influenciada por diversos fatores ambientais, como a idade, a raça, a duração da luz do dia, a umidade relativa e a temperatura. O manejo adequado desses fatores é fundamental para melhorar a qualidade do sêmen utilizado em programas de reprodução e inseminação artificial. A seleção dos melhores animais para acasalamento ou inseminação artificial deve ser baseada em características reprodutivas e na composição bioquímica do esperma. Além disso, fatores como genótipo, idade, estação do ano, alimentação e condições ambientais devem ser considerados na escolha dos reprodutores (MERT et al., 2009).

2.3 Criopreservação de sêmen

Spallanzani, em 1776, foi o primeiro a observar que a atividade metabólica dos espermatozoides era reduzida com a diminuição da temperatura, permitindo que estes fossem armazenados por um período de tempo superior ao observado em temperatura ambiente (ENGLAND E PLUMMER, 1993). Posteriormente, Polge et al. (1949) descreveram a ação crioprotetora do glicerol, o que proporcionou um impacto significativo nos protocolos de congelação. Os métodos de congelação incluem etapas como a diluição, refrigeração, penetração do crioprotetor, envasamento, congelação, armazenamento e descongelação (HAMMERSTEDT et al., 1990).

Existem diversas aplicações biotecnológicas para a criopreservação em diferentes campos, sendo a preservação de células um dos principais destaques. Essas células possuem grande utilidade em áreas como medicina humana, veterinária e aquicultura (CRUZ, 2022). Essa técnica tem se mostrado uma importante ferramenta para a melhoria genética de espécies domésticas na pecuária, bem como para a preservação de raças exóticas e localmente adaptadas.

Além disso, a congelação em temperaturas ultra baixas tem demonstrado potencial para resolver problemas relacionados à infertilidade humana e na preservação de sêmen para posterior inseminação artificial, bem como no armazenamento de DNA para conservação da biodiversidade. Estudos indicam que, na espécie ovina, o sêmen pode permanecer viável por até 27 anos após a criopreservação, sem afetar sua fertilidade (PADILHA et al., 2012).

A criopreservação é uma técnica amplamente utilizada na medicina veterinária, especialmente na preservação da genética animal. Ela permite o armazenamento de gametas masculinos e femininos, os quais podem ser utilizados tanto em processos reprodutivos comerciais quanto na conservação de espécies ameaçadas de extinção. Essa técnica é capaz de estocar sêmen de animais de alto valor zootécnico por tempo indeterminado, o que maximiza o poder reprodutivo do macho e possibilita o uso dos seus gametas até mesmo após a sua morte. (SILVA, 2011).

A criopreservação de espermatozoides resulta em uma diminuição na motilidade espermática e danos irreversíveis nas células sobreviventes, levando a uma redução na fertilidade quando comparada com o sêmen fresco (WATSON, 2000). A redução na motilidade após o processo de congelamento e descongelamento do espermatozoide pode ser explicada, em parte, pelas alterações no transporte ativo e permeabilidade da membrana plasmática da região caudal, bem como pela disponibilidade de energia ou danos nos constituintes do axonema (DE LAMIRANDE e GAGNON, 1995; WATSON, 2000)

Durante a criopreservação de espermatozoides, o procedimento de congelamento pode provocar danos ou morte celular ao diminuir ou interromper algumas reações bioquímicas (SONGSASEN e LEIBO, 1997). A membrana plasmática do espermatozoide é identificada como o local principal de dano durante o processo de criopreservação (WATSON, 1995). Os processos de congelamento e descongelamento podem levar a grandes alterações no volume de água (NOILES et al., 1995; MEDEIROS, 2003), provocando instabilidade na bicamada lipídica da membrana plasmática, além de alterações nos componentes da membrana celular, como a desnaturação de proteínas da membrana. O processo também pode afetar o metabolismo energético celular, a osmolaridade e o pH (WATSON, 2000).

O conteúdo de colesterol e fosfolípidios presentes na membrana espermática desempenha uma função reguladora no processo de capacitação

espermática. Estudos demonstram que o colesterol é capaz de exercer um efeito positivo na estabilidade da membrana, e que espermatozoides com baixo conteúdo de colesterol na membrana apresentam maior susceptibilidade a choques térmicos (AURICH et al., 1997). Esse fenômeno foi previamente descrito em touros, carneiros e suínos (NOILES et al., 1995; WATSON, 1995).

Os lipídios e proteínas da membrana apresentam distribuição assimétrica, permitindo a fluidez dos componentes da membrana (OLLERO et al., 1998). Contudo, a congelação contínua dos espermatozoides resulta em redução da temperatura, provocando mudanças que causam alterações físicas da membrana, que passa do estado líquido para o estado gel, com as cadeias de ácidos graxos distribuídas aleatoriamente e ordenadas paralelamente, produzindo uma estrutura rígida. Isso torna a membrana suscetível a rupturas e fusões, além de permeável a íons (HAMMERSTEDT et al., 1990). Conseqüentemente, a permeabilidade seletiva da membrana plasmática pode ser comprometida durante a refrigeração (4 °C) da célula espermática, uma vez que os fosfolipídios sofrem rearranjo, assumindo configuração hexagonal tipo II e formando micelas com as cabeças polares hidrofílicas posicionadas para dentro e as caudas hidrofóbicas direcionadas para o lado externo (WATSON, 1995; HOLT, 2000; VALLÉ, 2001).

Durante os processos de congelação e descongelação, as principais crioinjúrias que afetam a motilidade e a integridade morfológica dos espermatozoides podem reduzir a produção de energia e, conseqüentemente, a fertilidade (HOLT, 2000; WATSON, 2000). Estes danos podem incluir lesões na membrana acrossomal e no DNA, cristalização dos solutos intracelulares e alterações nas propriedades enzimáticas dos espermatozoides, além de diminuir sua longevidade pós-descongelação e promover a capacitação espermática precoce (OEHINGER et al., 2000). Embora não tenham sido detectados efeitos negativos na espécie ovina, os microtúbulos flagelares da célula espermática também podem sofrer alterações durante o processo de criopreservação. (JONES e MANN, 1977).

Estudos sugerem que a zona crítica de temperatura para a congelação varia entre -15 a -30 °C (POLGE, 1957) e 20 a 0 °C (SALAMON e MAXWELL, 1995; SALAMON e MAXWELL, 2000), sendo responsáveis pelo aparecimento de danos irreversíveis aos espermatozoides e evidenciando que, se a taxa de congelação não for reduzida corretamente, todas as células serão danificadas quando submetidas à temperatura de -80 °C (POLGE, 1957). Entre as temperaturas

de -5°C e -10°C, é iniciada a formação de cristais de gelo no ambiente extracelular, enquanto o ambiente intracelular permanece super resfriado e não congelado devido à capacidade da membrana plasmática de impedir a formação de cristais de gelo no citoplasma (GAO e CRITSER, 2000). O desafio enfrentado pelas células não se limita a tolerar temperaturas baixas, mas também a atravessar a faixa de temperatura que varia de 0 a -15 °C, que ocorre durante os processos de congelação e descongelação (DROBNIS et al., 1993).

Segundo Robertson et al. (1990), a refrigeração rápida dos espermatozoides de mamíferos domésticos até a temperatura de 0 °C pode resultar em choque térmico, perda de permeabilidade seletiva da membrana plasmática ao cálcio e redução da motilidade, podendo causar necrose celular. Durante a refrigeração, ocorre a separação da fase lipídica, o que agrupa as proteínas integrais e afeta sua função, como os canais iônicos de cálcio. Isso leva a um aumento da permeabilidade da membrana, o que acarreta em transtornos celulares na capacitação e na fusão das membranas plasmática e acrossomal externa (SONGSASEN e LEIBO, 1997; WATSON, 2000).

Em estudos realizados em ovinos (KUMAR et al., 2003) e caninos (SANTOS et al., 2003), foi observado que a curva lenta de refrigeração apresentou melhores resultados de motilidade espermática pós-descongelação quando comparada à curva rápida. Isso ocorre porque, durante a refrigeração rápida, o tempo disponível para desidratação dos espermatozoides é reduzido, o que aumenta a possibilidade de formação de cristais de gelo intracelulares e consequentes danos irreversíveis à célula, como sugerido por Muldrew e Mc Gann (1994) e Gao e Citser (2000). Já na congelação lenta, a desidratação celular ocorre devido ao meio extracelular hipertônico, eliminando a formação de grandes cristais de gelo intracelulares que prejudicam a integridade celular. No entanto, a congelação rápida seguida de descongelação rápida pode preservar a integridade de um grande número de células, possivelmente por evitar a formação de pequenos cristais de gelo intracelulares que ocorrem durante a recristalização, conforme descrito em estudos anteriores (WATSON, 1995; SONGSASEN e LEIBO, 1997; HOLT, 2000).

A diminuição da viabilidade de espermatozoides ovinos criopreservados está relacionada ao aumento da desnaturação da cromatina. Os danos ao DNA causados durante a criopreservação são considerados os principais responsáveis pela baixa taxa de fertilidade do sêmen ovino (PERIS et al., 2004) e humano (BENCHAIB et al.,

2003), em comparação com o sêmen fresco. Além disso, mudanças estruturais nas mitocôndrias ocorrem durante a refrigeração a 5 °C, incluindo condensação e perda do material mitocondrial (JONES e MANN, 1977), com mudanças na forma da mitocôndria (WOOLLEY e RICHARDSON, 1978). A criopreservação também pode levar a grandes cristais de gelo nas mitocôndrias e perdas de proteínas após a descongelação (QUINN et al., 1980), prejudicando a produção de adenosinatrifosfato (ATP; WATSON, 1995).

Para que a criopreservação tenha sucesso é necessário o conhecimento sobre os meios diluentes, crioprotetores mais utilizados e de melhor eficácia, sobre as curvas de congelação utilizadas para determinada espécie animal e sobre a fisiologia espermática, pois esses conhecimentos são essenciais na recuperação espermática após a descongelação, visando altas taxas de fertilidade. (PURDY, 2006)

2.4 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é uma condição na qual há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a capacidade antioxidante das células. Essa condição pode levar a danos na estrutura e função celular, incluindo aumento da permeabilidade da membrana, perda de estrutura do DNA e morte celular (BANDAY et al., 2017). A presença de ácidos graxos poli-insaturados na membrana plasmática dos espermatozoides é uma das principais causas do estresse oxidativo, uma vez que esses compostos são facilmente oxidados pelo oxigênio e produzem ROS, como peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical hidroxila (OH⁻), radical superóxido (O₂⁻) e óxido nítrico (NO). (BANDAY et al., 2017).

A principal fonte de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) no plasma seminal é o metabolismo dos espermatozoides. As ROS são moléculas que contêm oxigênio e possuem atividade pró-oxidante, mas também são essenciais para funções normais do esperma, tais como mecanismos de transdução de sinal, incluindo a taxa de hiperativação e a capacidade dos espermatozoides de sofrer reação acrossômica. No entanto, o desequilíbrio entre substâncias pró-oxidativas e antioxidantes no sêmen pode levar ao estresse oxidativo, resultando em distúrbios metabólicos e funcionais nas células germinativas masculinas.

A lesão causada pelos ROS aos espermatozoides é resultado de uma

reação oxidativa que ocorre nos lipídios da membrana do espermatozoide. Essa reação é desencadeada pelos ROS e acelerada por íons de metais de transição, como o Fe^{2+} (DOBRAKOWSKI et al., 2017). Durante a criopreservação, as ultraestruturas da membrana do esperma são interrompidas, aumentando a susceptibilidade à peroxidação lipídica. As consequências irreversíveis dessa peroxidação são: perda de motilidade, inibição da respiração, vazamento enzimático intracelular, dano ao DNA e incapacidade de penetrar no oócito (NASEER et al., 2015).

O desequilíbrio entre a produção e a eliminação de ROS resulta em estresse oxidativo, uma vez que o sistema antioxidante endógeno não é suficiente para lidar com o excesso de ROS gerado, principalmente a partir de espermatozoides mortos (BANDAY et al., 2017). Como os mecanismos internos de reparo nos espermatozoides são limitados e a contribuição dos antioxidantes do plasma seminal é menos efetiva devido à diluição do sêmen para armazenamento, a inclusão de antioxidantes exógenos pode ser benéfica na manutenção do potencial de fertilização dos espermatozoides.

Assim, a adição de antioxidantes adequados no diluidor usado para congelar o sêmen pode reduzir o estresse oxidativo e proteger os espermatozoides durante o congelamento e descongelamento (BANDAY et al., 2017; LA FALCI et al., 2011).

O sistema antioxidante endógeno não é capaz de eliminar o excesso de ROS gerado principalmente a partir de espermatozoides mortos levando a um desequilíbrio entre a produção e eliminação de ROS resultando em estresse oxidativo (BANDAY et al., 2017). Como os mecanismos internos de reparo nos espermatozoides são limitados e a contribuição dos antioxidantes do plasma seminal é menos efetiva devido à diluição do sêmen para armazenamento, é provável que um suprimento exógeno de antioxidantes seja importante para manter o potencial de fertilização (LA FALCI et al., 2011).

Para isso, a inclusão de um antioxidante adequado no diluidor usado para congelar o sêmen pode ser benéfica na redução do estresse oxidativo, protegendo assim os espermatozoides durante o congelamento e descongelamento (BANDAY et al., 2017).

2.5 Antioxidantes

Os antioxidantes são moléculas que reduzem essa reação oxidativa e retardam o efeito negativo dos radicais livres (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006) agindo de várias formas no organismo, evitando a formação de ROS produzido pelo metabolismo celular ou por fontes externas impedindo os ataques aos lipídios, ácidos graxos e DNA (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

O sistema antioxidante endógeno nos espermatozoides pode não ser suficiente na prevenção da peroxidação lipídica durante o processo de criopreservação do sêmen. Por isso, várias pesquisas têm sido feitas para enriquecer o sêmen através da adição de substâncias antioxidantes naturais ou sintéticas (HASHIM; ESLAMI, 2016).

Quando essas células são expostas ao processo de criopreservação elas sofrem várias alterações negativas como uma redução de motilidade espermática, diminuição da integridade acrossomal, integridade da membrana plasmática, viabilidade espermática, acarretando no prejuízo a viabilidade espermática e na capacidade fecundante em função da peroxidação lipídica gerada pelas ROS (BALL, 2008).

Os espermatozoides apresentam um sistema de defesa antioxidante enzimático e um não enzimático. O sistema enzimático é composto pelas enzimas: superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT), peroxiredoxinas (Prx), glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPx). E o sistema não enzimático corresponde a muitos compostos de baixo peso molecular, incluindo glutathione reduzida (GSH), as vitaminas C e E, diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico e ácido lipóico (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

As defesas antioxidantes enzimáticas atuam removendo as ROS ou convertendo-as em produtos intermediários não tóxicos. Inúmeras evidências da atividade protetora dos componentes do sistema antioxidante foram observadas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997), como o combate da LPO e da apoptose espermática, prevenção das lesões de reperfusão pós-isquemia de coração, rim, fígado e intestino, desempenhada por enzimas como o SOD e CAT (SHAN et al., 1990).

A primeira linha enzimática de defesa antioxidante contra ânions superóxido é o complexo SOD, devendo ser conjugado com CAT ou GPx para prevenir a ação do

peróxido de hidrogênio, que é produzido na reação catalisada pela SOD (DOBRAKOWSKI et al., 2017). As superóxidos dismutases e as redutases precisam agir juntamente com enzimas que removem H₂O₂. As CAT estão em nenhuma ou em baixa quantidade na mitocôndria, onde grande quantidade de oxigênio é produzido (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006).

A GR é um antioxidante tripeptídeo, que age juntamente com o α -tocoferol e com o ácido ascórbico, sendo fundamental para mantê-los na forma reduzida. Atua como cofator enzimático, tendo importância na reação catalisada pela glutathione peroxidase (FUNAHASHI; SANO, 2005), e na neutralização do ânion superóxido (SILVA et al., 2013).

A GPx é uma enzima selênio dependente, encontrada nos espermatozoides de mamíferos (CÁRDENAS; PEDRAZA, 2006), e faz parte da estrutura da cápsula mitocondrial da peça intermediária e no flagelo dos espermatozoides (IZQUIERDO et al., 2009). É considerado um dos principais sistemas de defesa antioxidante, podendo agir com outros peróxidos que não o H₂O₂ (SILVA et al., 2013).

Os antioxidantes não enzimáticos agem como agente redutor - doador de elétrons, além de se ligarem a moléculas de O₂ que possam ser substrato para formação de ROS, ou seja, de forma geral atuam prevenindo ou minimizando os danos provocados pelas ROS (SILVA, 2010). Dentre os antioxidantes envolvidos diretamente na reprodução, merecem destaque a glutathione reduzida (GSH); o ácido ascórbico (vitamina C), o tocoferol (vitamina E) e o ácido α -lipoico (ANDRADE et al., 2010).

A GSH está presente em todo organismo animal; não apenas em células somáticas, mas em gametas também. A proteção contra o dano oxidativo conferida pela GSH se deve ao seu grupamento sulfidril (SH); pode estar em duas formas: a reduzida e a oxidada (GSSG). A ação protetora da GSH é facilitada pelas interações com enzimas associadas tais como a glutathione redutase e a glutathione peroxidase (LUBERDA, 2005). No mesmo sentido, AITKEN et al., (1993) cita que o principal antioxidante não enzimático é a GSH e sua função está relacionada à suas interações com outros sistemas (p.ex. a superóxido dismutase) como mecanismo profilático às ROS. A GSH extracelular previne peroxidação lipídica das membranas celulares dos gametas, através da remoção do excesso de ROS no meio para inseminação (BOQUEST et al., 1999).

Outro ácido com função antioxidante é o ácido ascórbico, também conhecido como vitamina C (uma vitamina hidrossolúvel). Ele tem capacidade de reduzir a quantidade de ROS, prevenindo a formação de hidroperóxido de lipídios nas lipoproteínas plasmáticas, protegendo a célula dos danos oxidativos (ÁLVAREZ et al., 2006). O sêmen caprino criopreservado na presença desta vitamina apresentou incremento na motilidade, na integridade de membrana plasmática, integridade de acrossoma, morfologia e viabilidade dos espermatozoides de acordo com Memon et al. (2012).

O tocoferol (vitamina E) é considerado como o principal antioxidante lipossolúvel responsável por proteger os PUFA's contra a peroxidação. Seu efeito decorre da sua capacidade em prevenir a LPO e reduzir a produção de malonaldeído, o que é possível pelo fato de atuar como quelante das ROS produzidas durante a lipoperoxidação (SILVA; GUERRA, 2012).

O ácido α -lipoico (ALA) é um antioxidante natural conhecido por suas complexas propriedades antioxidantes (GIBU et al., 2009). Esse ácido pode ser fornecido por meio da dieta ou pela síntese mitocondrial. É rapidamente absorvido e transportado para o compartimento intracelular, sendo reduzido a ácido dihidrolipoico (DHLA). Este processo produz dois grupos tiol livres, que são responsáveis pelo efeito antioxidante superior da forma reduzida (DHLA) em comparação com a forma oxidada (GIBU et al., 2009).

Para esse fim, a suplementação de um antioxidante apropriado ao diluidor pode ser benéfica, reduzindo o estresse oxidativo, e por conseguinte, protegendo os espermatozoides durante o processo de criopreservação e descongelação (BANDAY et al., 2017).

2.6 Jambolão

O fruto jambolão (*Syzygium cumini*) conhecido em diversos países com outras denominações, como jambul, ameixa preta, azeitona, jamelão, java plum, madan, jambol, jaman, jamborão, baguaçu, jalão, João-bolão, manjelão, baga-de-freira, oliveira, azeitona-roxa, brinco-de-viúva ou guapê. É uma planta pertence à espécie Myrtacea e é oriunda da asiática tropical (Índia), porém, adaptada ao Brasil e distribuída por todo o litoral brasileiro (DAS; SARMA, 2009; SILVA et al., 2012).

A planta foi introduzida em muitos países tropicais e é muito bem adaptada às condições brasileiras, pois cresce em diferentes tipos de solo e é encontrada em diferentes regiões do Brasil. (TAVARES et al., 2016).

Segundo Mussi (2018) em alguns países é comum a comercialização do fruto e de seus subprodutos, porém no Brasil o jambolão é consumido na maioria das vezes *in natura*. A comercialização do fruto e a fabricação de subprodutos são bem restritas. Por isso, há um grande desperdício desse fruto na época de safras, por falta de pesquisas sobre os benefícios dessa fruta e de seus resíduos (casca, caroço e folha) a saúde humana e animal (DIAS, 2017).

O fruto do jambolão apresenta em torno de 86% de umidade, 0,6% de lipídios, 1,4% de proteínas, 5,91% de acidez (ácido cítrico), 17% de carboidratos totais, 1% de açúcares redutores, 0,28% de fibra alimentar, e pH de 3,9. O principal mineral encontrado nesta fruta é o fósforo e a vitamina em maior abundância é a vitamina C (BALIGA et al., 2011).

O jambolão possui diversos fatores fotoquímicos, os quais são benéficos. O mesocarpo do jambolão é rico em carotenoides, delphinidinas, petunidinas, malvidina-diglicosídeos e antocianinas, principal substância antioxidante do jambolão. (FARIA et al., 2011).

De acordo com SILVA e SÁ (2008), 80% das plantas utilizadas no sul da Índia para fins terapêuticos existem no Brasil, inclusive o jambolão. As partes da planta do jambolão (folhas, casca de árvore, frutos, sementes) são amplamente utilizadas na medicina popular em virtude de suas propriedades funcionais. A literatura reporta diversos compostos bioativos identificados em seu fruto, como carotenoides e compostos fenólicos (flavonoides, ácido elágico, taninos e antocianinas demonstrando o seu potencial de atividade antioxidante, antifúngica, antibacterianas, entre outras (SHARMA et al., 2015; SINGH et al., 2016).

O mesocarpo do jambolão apresenta efeitos antioxidantes, que são substâncias com capacidade para evitar ou retardar a oxidação dos lipídeos, proteínas, DNA e proteger os compostos ou os tecidos de danos provocados por radicais livres (JAGETIA; SHETTY; VIDYASAGAR, 2012).

Sabe-se que o estágio de maturação é um fator importante que influencia a qualidade da composição, devido ao fato de que durante o amadurecimento ocorrem variações (bioquímicas, fisiológicas e estruturais) que determinam a

qualidade do fruto, quanto mais escuro o jambolão maior sua concentração de antioxidantes (TLILI et al., 2014).

Estudos recentes utilizando o extrato da polpa do jambolão indicam que a adição desse extrato ao diluidor seminal pode melhorar significativamente vários parâmetros de qualidade do sêmen bovino criopreservado. (SULEMAN et al., 2021)

2.7 Ácido Palmítico

Os ácidos graxos são moléculas compostas de uma cadeia de hidrocarboneto e um grupamento carboxila, classificados como saturados e insaturados. São formados por fosfolípido, diglicerídeos e triglicerídeos sendo estes primeiros constituintes primários das membranas biológicas (HAMES; HOOPER, 1997). Podendo também ser encontrados nas membranas espermáticas, os ácidos Palmítico e Esteárico (AITKEN; BAKER, 2006).

A composição de ácidos graxos dos espermatozoides tem se mostrado importante para a função espermática, uma vez que incorporados à membrana são importantes para a motilidade dos espermatozoides, a viabilidade espermática e o processo de fusão entre o espermatozoide e o oócito (LEWIS; MACCARRONE, 2009).

Em humanos os espermatozoides contêm alta quantidade de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), com níveis especialmente altos de ácido docosahexaenóico (DHA, C22: 6 n-3). Estudos mostram que os AGPIs ômega-3 nos espermatozoides e, especialmente, o deco-hexanóico (DHA), modulam a concentração, morfologia e motilidade dos espermatozoides de forma positiva (MARTINEZ-SOTO et al., 2013).

Os ácidos graxos, em especial os fosfolípidios sofrem uma grande redução durante a fase epididimária, os espermatozoides bovinos chegam a perder metade dos seus principais fosfolípidios. Esta perda é necessária, uma vez que a retenção de ácidos graxos (saturados, monoinsaturados e poliinsaturados) indica imaturidade e/ou defeito espermático (POULOS et al., 1973). Ahluwalia e Holman (1969) estudando a estrutura espermática, observaram que a cauda do espermatozoide mantém mais ácidos graxos poliinsaturados do tipo n-3 do que a cabeça espermática, enquanto a cabeça possuía uma maior concentração de ácidos graxos poliinsaturados tipo n-6 que as caudas.

O ácido palmítico e o ácido esteárico foram identificados como os ácidos graxos mais saturados presente no sêmen humano (KOPPERS et al., 2010). Altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados tipo n-6, foram encontrados em homens inférteis, apresentando uma relação positiva com a diminuição da concentração espermática, da motilidade e maior contagem de células patológicas (SAFARINEJAD et al., 2010).

No plasma seminal os ácidos graxos docosahexaenóico (DHA), palmítico, oleico, linoleico, araquidônico, linolênico e esteárico (TAVILANI, 2006), conferem proteção aos espermatozoides contra choques térmicos e manutenção da motilidade espermática, desempenham importante papel na funcionalidade da célula, e conseqüentemente na capacidade de fertilização (GULAYA et al., 2001).

A adição de ácido oleico-linoléico teve um efeito benéfico na preservação da viabilidade de espermatozoides ovinos (PERÉZ-PÉ et al., 2001). A adição de ácido graxos exógenos melhorou a motilidade de espermatozoides congelados e descongelados e a viabilidade do sêmen de touro (TAKAHASHI et al., 2012).

Um resultado recente revelou que os espermatozoides de javali podem utilizar o ácido palmítico e o ácido oleico, adicionados em diluidor citrato trissódico, como substratos de energia para a produção de ATP ao longo de um período de tempo de até 3 h a 37°C (ZHU. et al., 2020).

Em trabalho realizado adicionando-se ácido palmítico na concentração de 100µM ao diluidor Tris-gema, avaliou-se que essa adição foi capaz de preservar a integridade da membrana plasmática de espermatozoides caninos durante o processo de criopreservação do sêmen (SOUSA FILHO et al., 2021).

2.8 Análises espermáticas

A análise seminal é uma ferramenta fundamental para avaliar a qualidade do esperma armazenado e determinar o potencial de fertilidade masculina, medindo sua funcionalidade, integridade e viabilidade após o processo de criopreservação (KUÇUK et al., 2014).

Para avaliar a qualidade seminal, é empregada a avaliação convencional do ejaculado em que são observadas características físicas como o volume, aspecto, turbilhão ou movimento de massa, motilidade total e progressiva individual, vigor e concentração, além da morfologia e dos defeitos espermáticos maiores e menores (CBRA, 2013).

O ejaculado de pequenos ruminantes é caracterizado por um volume que varia entre 0,5 e 1,5 mililitros e um total de 3 a 5 bilhões de espermatozoides ejaculados. Deve apresentar pelo menos 70% de motilidade espermática, motilidade massal ≥ 4 (escala de 0 – 5), concentração de $2 - 5 \times 10^9$ espermatozoides/mL e defeitos maiores $\leq 10\%$ (CBRA, 2013). Os defeitos espermáticos podem estar localizados no acrossoma, cabeça, peça intermediária, cauda ou apresentar anomalias e malformações (BLOM, 1973).

O teste de termorresistência (TTR) permite verificar a diminuição na curva linear nos valores de motilidade e vigor com o decorrer do tempo de incubação durante o teste de exaustão. Uma possível explicação para tal diminuição seria devido ao consumo de suas substâncias nutritivas no início do teste, perda de componentes intracelulares ou lesões estruturais na cauda das células espermáticas, diminuindo sua viabilidade nas primeiras horas (BARROS et al., 2013).

A verificação da motilidade e morfologia espermática são fatores importantes para determinar a qualidade seminal. A Análise Espermática Assistida por Computador (CASA) automatiza as análises com maior objetividade e agilidade, possibilitando a visualização, digitalização e análise de imagens sucessivas das células espermáticas, fornecendo informações precisas e significativas do movimento individual de cada espermatozoide. Esse sistema também pode ser utilizado para calcular o número de células por unidade de volume e capturar dados aproximados de morfologia de cada célula examinada (AMANN; KATZ, 2004).

A análise dos vários parâmetros da motilidade espermática é realizada por um sistema estroboscópico de alta precisão controlado por computador, além de utilizar videomicrografia que é responsável pelo monitoramento constante e análise sequencial do movimento da célula espermática (MORTIMER, 2000; AMANN; KATZ, 2004).

O uso do sistema de análise de sêmen computadorizado (CASA) para avaliar a motilidade espermática é mencionado por Mortimer (2000) e Amann e Katz (2004), que explicam que o movimento da cabeça do espermatozoide é avaliado, apesar da cauda ser responsável pela motilidade. Isso se deve à movimentação mais lenta da cabeça, o que permite imagens mais nítidas. Além disso, o sistema utiliza um padrão de tamanho da cabeça espermática para cada espécie, permitindo a identificação de objetos que não se enquadrem nesse padrão. Verstegen et al.

(2002) mencionam os parâmetros obtidos através do CASA, incluindo motilidade total, motilidade progressiva, velocidades do percurso curvilíneo, médio e em linha reta, retilinearidade, linearidade, oscilação, frequência de batimento cruzado e deslocamento lateral da cabeça.

Peña et al. (2005) destacam a importância da integridade das membranas espermáticas para a viabilidade e fecundação espermática, explicando que a membrana plasmática e a membrana acrossomal devem estar íntegras e funcionais para que ocorra a fecundação. Rodriguez-Martínez (2007) complementa que mesmo com a integridade da membrana plasmática, se ela estiver funcionalmente instável, a célula germinativa masculina não conseguirá interagir com o ambiente do trato genital feminino.

Outra análise para avaliar a qualidade espermática é o uso de corantes fluorescentes, como explicado por Sousa et al. (2012). Diversas sondas podem ser utilizadas para identificar condições subcelulares, como o Hoechst 33258, YoPro-1, Iodeto de Propídeo, Diacetato de Carboxifluoresceína e SYBR-14®. Silva e Gadella (2006) mencionam a avaliação da integridade da membrana plasmática com sondas que têm afinidade por DNA, enquanto Coletto et al. (2002) destacam a associação dessas sondas para uma identificação mais confiável da membrana plasmática espermática preservada.

Silva e Gadella (2006) observaram que as lectinas ao serem utilizadas, são capazes de ligar-se a carboidratos existentes exclusivamente nas glicoproteínas da membrana acrossomal. Substâncias geralmente derivadas da ervilha da espécie *Pisum sativum* (PSA) e do amendoim da espécie *Arachis hypogaea* (PNA), são associadas à fluoróforos, permitindo sua visualização ao microscópio de imunofluorescência, sendo mais utilizado o Isocianato de Fluoresceína (FITC).

As lectinas descritas acima possuem diferentes locais de atuação. A PNA se liga aos glicoconjugados da membrana acrossomal externa e a PSA apresenta afinidade pela membrana acrossomal interna, precisamente aos grupos sacarídeos da glicoproteína pró-acrosina (HOLDEN et al., 1990). Logo, ao utilizar PSA, caso a membrana plasmática esteja intacta não haverá fluorescência. Contudo, se a membrana plasmática estiver lesionada, como nos casos de fixação da célula espermática, observa-se fluorescência na região do acrossoma (SILVA; GADELLA, 2006).

Grande parte do ATP necessário ao metabolismo total do espermatozoide

vem das mitocôndrias. Para avaliar a função mitocondrial espermática tem sido utilizado diferentes sondas fluorescentes, onde estas, são ativamente transportadas nas mitocôndrias que possuem respiração ativa. Logo, quanto mais ativa a respiração mitocondrial, mais corante é acumulado nesta organela (GRAHAM; MOCÉ, 2005).

Uma das sondas eficazes na classificação do potencial da membrana mitocondrial é o fluorocromo catiônico lipofílico (JC-1). Esta sonda em concentrações mais baixas permanece no seu estado monomérico e fluoresce em verde, enquanto em concentrações elevadas, forma agregados que fluorescem na cor laranja. Sendo assim, o JC-1 possui a capacidade de diferenciar uma mitocôndria funcional, além de permitir que os diferentes níveis da função mitocondrial sejam diferenciados pela intensidade da cor laranja na mitocôndria (GUTHRIE; WELCH, 2012).

CAPÍTULO I

Efeito da adição do ácido palmítico ao diluidor Tris-gema sobre a qualidade de semen ovino pós-criopreservação

[Effect of the addition of palmitic acid to Tris–egg yolk extender on post-thaw quality of ovine semen]

M. A. C. Sousa Filho¹ Souza Junior²

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da suplementação com Ácido Palmítico em concentrações de 100 μ M e 200 μ M, adicionados ao diluidor Tris-gema, sobre a qualidade dos espermatozoides ovinos após o processo de criopreservação. Para tanto, foi realizada a coleta de amostras de sêmen de seis carneiros clinicamente saudáveis da raça Dorper, com parâmetros andrológicos/seminais de acordo com a espécie, segundo o colégio brasileiro de reprodução. O pool das amostras foi diluído em Tris-gema e divididos em três tratamentos: Controle (Tris-gema), T1 (Tris-gema + 100 μ M) e T2 (Tris-gema + 200 μ M). As amostras foram criopreservadas pelo método automatizado na curva lenta para ovinos e, após 15 dias, foram realizadas análises pós-criopreservação, incluindo o teste de termorresistência (TTR), testes de sondas para integridade da membrana plasmática e atividade mitocondrial, bem como análise computadorizada de espermatozoides. A análise estatística descritiva foi realizada nos dados usando frequência, média, desvio padrão e testes de normalidade. ANOVA e teste de Kruskal-Wallis foram usados para comparar médias entre os grupos. Teste t pareado e teste de Wilcoxon foram usados para comparar médias antes e após congelação. O teste de Friedman foi utilizado para verificar diferenças entre tempos, seguido de testes post-hoc. Os dados foram analisados no IBM SPSS 20.0, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). O TTR mostrou que o tratamento T1 manteve o valor de motilidade espermática significativamente superior no tempo 60min. Além disso, os tratamentos T1 e T2 apresentaram melhor resposta à manutenção da integridade da membrana plasmática em comparação com o grupo controle. Conclui-se que a adição do ácido palmítico ao diluidor Tris-gema na concentração de 100 μ M e 200 μ M é capaz de preservar a integridade da membrana plasmática e a cinética espermática durante o processo de criopreservação do sêmen ovino.

Palavras-chave: semen, criopreservação, antioxidantes, ácido palmítico

INTRODUÇÃO

A qualidade do sêmen desempenha um papel fundamental no sucesso da inseminação artificial (IA) em ovinos, especialmente com o uso crescente da criopreservação como uma técnica reprodutiva (HOLT, 2000). Durante o processo de criopreservação, ocorre uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS), que pode levar à redução dos antioxidantes presentes no plasma seminal e impactar negativamente a eficiência reprodutiva (BARROS et al., 2020). Isso resulta em efeitos prejudiciais nos espermatozoides, como diminuição da motilidade, inativação de enzimas glicolíticas e deterioração de lipídios de membrana, proteínas e DNA nuclear (ASMA-UL-HUSNA et al., 2017). Portanto, preservar as características espermáticas durante esse processo é essencial para o sucesso da IA em ovinos.

Alguns estudos visam enriquecer o sêmen com antioxidantes naturais ou sintéticos devido à possível insuficiência do sistema antioxidante endógeno dos espermatozoides durante a criopreservação. A adição de antioxidantes nos meios diluentes protege os espermatozoides contra o estresse oxidativo, prevenindo danos oxidativos, mantendo a motilidade, vigor, integridade do DNA e das membranas espermáticas, e evitando, assim, reações adversas (HASHEM; ESLAMI, 2016; SILVA et al., 2017; CARMO SILVA, 2020). A integridade da membrana plasmática é crucial para a fertilização, mantendo o equilíbrio osmótico e prevenindo a morte celular (ALBERT et. al., 2010).

A composição de ácidos graxos na membrana desempenha um papel vital na função espermática, afetando a motilidade, viabilidade e fusão com o oócito (VERSTEGEN et al., 2012)

Considerando as implicações supracitadas, a inclusão de ácidos graxos saturados em fosfolipídios de membrana plasmática pode elevar a saturação e, conseqüentemente, reduzir o risco de peroxidação lipídica, mitigando, dessa forma, as conseqüências do procedimento de criopreservação.

Diante desse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação do ácido palmítico ao diluidor Tris-gema, sobre a qualidade do semen ovino após o processo de criopreservação.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina - PI, sob protocolo nº 745/2022.

Foram utilizados seis carneiros da raça Dorper, provenientes do Biotério de Produção de Ovinos do Colégio Técnico de Teresina (CTT) da UFPI, localizado na cidade de Teresina. Os carneiros foram mantidos sob regime semi-intensivo, em área com pastagem cultivada de capim *Tifton* sp. e *Mombaça* sp., dividida em piquetes, com água e sal mineral a vontade, e avaliados quanto à normalidade dos parâmetros andrológicos antes do estudo, de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (motilidade em massa: ≥ 3 ; motilidade espermática: $\geq 80\%$; vigor: ≥ 3 ; concentração: 1 a 3 bilhões espermatozoides/mL; número total de espermatozoides no ejaculado: 3 a 5 bilhões; espermatozoides morfolologicamente normais: $\geq 80\%$ (CBRA, 2013).

Foram realizadas seis coletas de sêmen dos seis reprodutores por semana, totalizando 36 ejaculados. Após cada etapa que se seguiu para a formação dos grupos experimentais o material foi analisado e selecionado conforme as características seminais desejáveis de reprodutores ovinos (CBRA, 2013). Posteriormente a formação do *pool* do ejaculado dos seis reprodutores o material foi diluído em diluidor Tris-gema (3,605 g de Tris; 2,024 g de ácido cítrico; 1,488g de frutose; 25 mg de gentamicina; 50.000 UI de penicilina; 100 ml de água destilada; 20% de gema de ovo e 5% de glicerol, com osmolaridade de 350 mOsm/kg e pH 6,8). Três grupos experimentais foram preparados na seguinte disposição: Controle (Tris-gema), T1 (Tris-gema + 100 μ M/ml de Ácido Palmítico) e T2 (Tris-gema + 200 μ M/ml de Ácido Palmítico).

Imediatamente após a coleta e processamento, as amostras de sêmen foram envasadas em palhetas de 0,25mL, à temperatura ambiente, para uma concentração final de 20×10^6 espermatozoides viáveis/palheta, e então foram congeladas em máquina automática em curva lenta para ovinos a uma taxa de resfriamento de $-0,5$ °C/min da temperatura ambiente (25 °C) até atingir a temperatura de 5 °C. Após estabilização a 5 °C por 1 hora, o congelamento foi realizado a -20 °C/min até atingir uma temperatura de -120 °C, quando as palhetas foram colocadas diretamente em nitrogênio líquido (-196 °C), e armazenadas até o

tempo de análise pós-criopreservação. A descongelação foi realizada após 15 dias da última coleta, em banho-maria, em uma temperatura de 37 °C por 30 segundos, para avaliação quanto à motilidade total e vigor espermático no teste de termorresistência (TTR) lento, além da integridade da membrana plasmática e atividade mitocondrial através de sondas fluorescentes, e funcionalidade da membrana plasmática espermática (HOST).

As amostras descongeladas foram acondicionadas em microtubos de 1,5 mL e incubadas a 37 °C, posteriormente, foram avaliadas quanto à motilidade total (MT - %) e o vigor espermático (1-5) por meio de microscopia de contraste de fase (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão) com placa aquecedora acoplada, em aumento de 400x, nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos pós-criopreservação (CBRA, 2013).

A cinética espermática foi avaliada por meio de um sistema de análise espermáticas computadorizada (CASA). O CASA consiste de um sistema de microscopia óptica de contraste de fase (Nikon TM H5505, Eclipse 50i, Japão), com iluminação estroboscópica, e uma fase quente a 37°C, uma câmera de vídeo (Basler Visão Technologie TM 166 A312FC, Ahrensburg, Alemanha) e um PC com o analisador de esperma Classe TM software (Microptics, SL, versão 3.2.0, Barcelona, Espanha). As variáveis avaliadas foram: motilidade total (MOT - $\mu\text{m/s}$), motilidade progressiva (MOP - $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL - $\mu\text{m/s}$), velocidade em linha reta (VSL - $\mu\text{m/s}$), velocidade média do percurso (VAP - $\mu\text{m/s}$), linearidade (LIN - %), retilinearidade (STR-%), deslocamento lateral de cabeça (ALH - μm), Wobble (WOB - %) e frequência de batimento cruzado (BCF-Hz), para cada espermatozoide analisado.

Para avaliação da integridade da membrana plasmática, foi utilizado o método de coloração dupla com diacetato de carboxifluoresceína (DCF; Sigma-Aldrich®, St.Louis, MO, USA) e iodeto de propídio (IP; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), modificado por Coletto *et al.* (2002), em que alíquotas de 50 μL de sêmen pós-criopreservação foram diluídas em 150 μL de Tris (3,605 g de Tris, 2,024 g de ácido cítrico, 1,488 g de frutose, 100 mL de água destilada) contendo 5 μL de DCF (0,46mg/mL em DMSO) e 20 μL de IP (0,5 mg/mL em PBS) e incubadas por 10 minutos a 37 °C. Um total de 200 espermatozoides foram avaliados em microscópio de epifluorescência (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão), com aumento de 400x, usando-se filtro de emissão DBP 580-630nm e excitação DBP 485/20nm. Os

espermatozoides foram classificados com membrana intacta, quando se apresentaram corados em verde, e com membrana danificada quando corados em vermelho.

A função mitocondrial foi determinada pela utilização de um fluorocromo catiônico lipofílico JC-1 (GUTHRIE E WELCH, 2006). Para tanto, alíquotas de 50µL de sêmen pós-descongelamento foram diluídas em 150 µL de Tris, contendo 5 µL de JC-1 (0,15mM em DMSO) e incubadas por 10 minutos a 37 °C. Um total de 200 espermatozoides foram avaliados em microscópio de epifluorescência (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão), com aumento de 1000 x, sob óleo de imersão, usando-se filtro de emissão LP 515nm e BP 450-490 nm para excitação. Os espermatozoides com a região da peça intermediária coradas em laranja foram classificados com alto potencial de membrana mitocondrial, e aqueles com a região da peça intermediária coradas em verde foram classificados com baixo potencial de membrana mitocondrial.

Para análise dos dados foram utilizados os procedimentos usuais da estatística descritiva, tais como distribuição de frequência absoluta (n) e relativa (%), média e desvio padrão, bem como o teste Shapiro-Wilk para verificar se os dados seguiram distribuição Normal. Utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA) e o teste não paramétrico H de Kruskal-Wallis para verificar diferença das médias entre os grupos.

Para comparação de médias antes e pós-criopreservação foi usado o teste não paramétrico de Wilcoxon. Para verificar diferença entre os tempos foi usado o teste não-paramétrico de Friedman e em seguida foi aplicado o *post-hoc* para verificar diferenças em pares. Os dados foram digitados no Excel e analisados no programa *IBM Statistical Package for the Social Sciences versão 20.0*. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas avaliações dos parâmetros de motilidade e vigor espermático imediatamente após a descongelamento do sêmen. Os valores encontrados para o teste TTR a 37°C, realizado nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos após a descongelamento do sêmen, foram submetidos ao teste não-paramétrico H de Kruskal-Wallis para verificar diferença das médias entre os grupos. Após o teste, foi encontrada diferença significativa nos valores de motilidade entre os

tratamentos no tempo 60min ($p < 0,05$). Observou-se que o grupo T1 manteve o parâmetro de motilidade significativamente superior no tempo 60 minutos.

Tabela 1. Motilidade total (%) e vigor de espermatozoides ovinos criopreservados em diluidor Tris-gema suplementado com Ácido Palmítico 100 μ M e 200 μ M, avaliados pelo TTR.

	Grupo			p-valor ²
	Controle	T1	T2	
TTR Motilidade				
0	29,17 \pm 8,01 ^a	32,50 \pm 10,84 ^a	31,67 \pm 10,33 ^a	0,870
60 min	15,00 \pm 5,75 ^{abB}	19,17 \pm 2,04 ^{abA}	13,33 \pm 2,58 ^{bB}	0,048
120 min	5,00 \pm 5,48 ^{bc}	11,67 \pm 5,16 ^{bc}	8,33 \pm 2,58 ^{bc}	0,074
180 min	0,83 \pm 2,04 ^c	3,33 \pm 2,58 ^c	0,50 \pm 1,22 ^c	0,076
p-valor ¹	<0,001	<0,001	<0,001	
TTR Vigor				
0	3,00 \pm 0,00 ^a	3,00 \pm 0,00 ^a	3,00 \pm 0,00 ^a	1,000
60 min	1,83 \pm 0,75 ^{ab}	2,33 \pm 0,52 ^{ab}	2,00 \pm 0,63 ^{ab}	0,492
120 min	0,67 \pm 0,52 ^c	1,33 \pm 0,52 ^{bc}	1,17 \pm 0,41 ^{bc}	0,081
180 min	0,17 \pm 0,41 ^c	0,83 \pm 0,75 ^c	0,17 \pm 0,41 ^c	0,183
p-valor ¹	<0,001	<0,001	<0,001	

Letras iguais não diferem entre si. Legenda: TTR = Teste de Termo Resistência; ¹Friedman; ²Kruskal-Wallis

A Tabela 1 revelou que a adição de 100 μ M de ácido palmítico ao diluidor seminal proporcionou uma maior resistência ao TTR uma hora após a descongelação. Nossos dados corroboram com os resultados obtidos por Kiernan, et al. (2013) que utilizou 100 μ M de ácido palmítico adicionado ao diluidor citrato sódico-gema, aumentando a motilidade total, motilidade progressiva e a viabilidade dos espermatozoides refrigerados de bovinos.

Esse resultado pode ser relacionado à presença de ácidos graxos saturados, incluindo ácido palmítico e esteárico, que conferem proteção aos espermatozoides contra choques térmicos e a manutenção da motilidade espermática (TAVILANI et al., 2007). Esses ácidos são essenciais para a funcionalidade da célula espermática e, portanto, para a capacidade de fertilização (GULAYA et al., 2001). Em particular, a composição de ácidos graxos da membrana afeta diretamente a estrutura, propriedades físicas e funções biológicas da membrana celular relacionadas à motilidade (CASARES et al., 2019)

O estudo realizado por Singh et al. (2019) comparou o efeito da adição de diferentes concentrações de ácido palmítico (0,25, 0,5, 0,75 e 1,0 μ M) ao diluidor Tris-ácido cítrico na congelabilidade do sêmen de búfalos. Os resultados indicaram que os diluidores contendo 0,5 μ M de ácido palmítico apresentaram valores significativamente maiores ($p < 0,05$) para motilidade progressiva, vigor e integridade

da membrana plasmática quando comparados ao grupo controle e aos demais grupos testados. Os autores concluíram que a suplementação de 0,5 μM de ácido palmítico no diluidor Tris-ácido cítrico melhorou a qualidade do sêmen de búfalos após a descongelação.

Tabela 2. Integridade da membrana plasmática (IMP), atividade mitocondrial (AM) pós-criopreservação de espermatozoides ovinos, criopreservados em meio suplementado com Ácido Palmítico 100 μM (T1) e 200 μM (T2).

Variáveis	Grupo			p-valor
	Controle	T1	T2	
IMP (%)	41,67 \pm 9,73 ^b	70,83 \pm 22,59 ^a	69,33 \pm 13,78 ^a	0,011¹
AM (%)	58,83 \pm 21,57	69,67 \pm 19,10	55,33 \pm 21,77	0,480 ¹

Letras iguais não diferem entre si. Legenda: IMP = Integridade da Membrana Plasmática, AM = Atividade Mitocondrial. ¹ANOVA.

A análise simultânea da integridade da membrana plasmática e do potencial mitocondrial é capaz de aumentar a acurácia da análise seminal, uma vez que proporciona uma maior quantidade de informações sobre as células espermáticas. É importante salientar que espermatozoides com estrutura íntegra são necessários para manter a capacidade de fertilização (BATISSACO et al., 2020).

Durante as análises de integridade da membrana plasmática utilizando sondas fluorescentes, foi possível observar que a adição de duas concentrações do ácido palmítico ao diluidor seminal apresentou uma resposta significativa na preservação da estrutura em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Essa preservação da integridade da membrana pode ser um dos fatores que explica a manutenção da motilidade do grupo T1 após uma hora quando avaliado no TTR, já que a membrana plasmática está diretamente relacionada com a motilidade espermática.

Esses resultados corroboram com a pesquisa realizada por Sousa Filho et al. (2021), que adicionaram o ácido palmítico na concentração de 100 μM ao diluidor Tris-gema e avaliaram a preservação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides caninos durante o processo de criopreservação do sêmen.

Em estudos recentes foi revelado que os espermatozoides de javali podem utilizar o ácido palmítico e o ácido oleico, adicionados em diluidor citrato trissódico, como substratos de energia para a produção de ATP ao longo de um período de tempo de até 3 h a 37°C (ZHU et al., 2020).

Outra importante avaliação é a dinâmica da motilidade oferecida pelo sistema CASA, fornecendo informações úteis para a determinação da qualidade seminal antes e após a criopreservação. A avaliação pelo programa CASA é um

importante indicador da qualidade espermática, com aferições mais objetivas e precisas dos parâmetros cinéticos espermáticos, realizando avaliações múltiplas e repetidas, nas quais estão relacionadas diretamente com a fertilidade espermática (GUARDIEIRO, 2013).

Conforme a tabela 3, que avalia os parâmetros cinéticos pós-criopreservação nos diferentes grupos, pode-se observar que a adição de ácido palmítico ao diluidor seminal não interferiu significativamente ($p > 0,05$) na maioria dos parâmetros observados, em relação ao grupo controle, com exceção do parâmetro ALH onde o grupo controle apresentou valor significativamente maior que os demais grupos ($p < 0,05$).

Tabela 3. Parâmetros da cinética espermática pelo CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) de espermatozoides ovinos criopreservados após suplementação em diferentes concentrações de ácido palmítico no diluidor Tris-gema.

Variáveis	Grupo			p-valor
	Controle	T1	T2	
MP	20,82 ± 10,77	14,50 ± 3,24	16,15 ± 8,54	0,402 ¹
MT	51,67 ± 13,74	45,93 ± 8,12	39,50 ± 14,74	0,274 ¹
VCL	61,22 ± 10,42	56,92 ± 4,33	57,47 ± 8,35	0,616 ¹
VSL	33,88 ± 11,09	32,92 ± 7,07	36,53 ± 9,17	0,785 ¹
VAP	42,65 ± 10,96	41,13 ± 6,73	43,17 ± 8,92	0,922 ¹
LIN	54,23 ± 9,01	57,42 ± 8,48	62,92 ± 8,81	0,254 ¹
STR	78,23 ± 7,01	79,47 ± 4,28	83,95 ± 4,77	0,198 ¹
WOB	68,98 ± 6,44	71,95 ± 7,02	74,63 ± 6,40	0,361 ¹
ALH	3,18 ± 0,44 ^a	2,58 ± 0,42 ^b	2,60 ± 0,25 ^b	0,023¹
BCF	9,60 ± 1,76	9,00 ± 1,80	9,55 ± 1,24	0,779 ¹

Letras iguais não diferem entre si. Legenda: MP = Motilidade progressiva, MT = Motilidade total, VCL = Velocidade curvilínea, VSL = Velocidade em linha reta, VAP = Velocidade média na passagem, LIN = Linearidade, STR = Retidão, WOB = Oscilação, ALH = Deslocamento de cabeça, BCF = Frequência dos batimentos. ¹ANOVA.

A amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH - μm) é a amplitude do deslocamento médio da cabeça do espermatozóide em sua trajetória real. A mensuração desse parâmetro está relacionada com a capacidade de penetração na zona pelúcida do óvulo, assim, a ALH é um dos parâmetros que tem efeito sobre a fertilização (MATOS et al., 2008). Apesar do valor de ALH apresentar-se maior no grupo controle, os outros grupos apresentaram valores dentro do preconizado para a espécie ovina, segundo Palacín et al. (2013).

Em um estudo conduzido por Kogan et al. (2021), foi realizada uma análise da relação entre a composição dos ácidos graxos presentes na membrana dos espermatozoides e suas motilidades progressivas. De acordo com a pesquisa, as concentrações de ácidos graxos saturados e poliinsaturados não apresentam diferenças significativas no sêmen fresco, porém após o processo de

criopreservação, os ácidos graxos saturados se tornam os principais componentes da membrana dos espermatozoides, uma vez que os ácidos graxos poliinsaturados sofrem degradação durante a congelação. É relevante ressaltar que o ácido palmítico assume um papel significativo na composição das membranas de espermatozoides que apresentam baixa motilidade progressiva.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a adição do ácido palmítico ao diluidor Tris-gema na concentração de 100 μ M e 200 μ M é capaz de preservar a integridade da membrana plasmática e a cinética espermática durante o processo de criopreservação do sêmen ovino.

REFERENCIAS

ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K WP. *Biologia Molecular da Célula*. 5a. Artmerd, editor. 2010.

ASMA-UL-HUSNA, M., HOSSAIN, M. S., SIDDIQUE, M. A. M., AFROZ, R., RAHMAN, M. M., & RASHID, M. H. Reactive Oxygen Species and Male Reproductive Health. *International Journal of Immunology and Immunotherapy*, 2017. 4(1), 1-11.

BARROS, F. N. (2020). Efeito do ácido araquidônico e do ácido oleico no diluidor tris-gema sobre a viabilidade espermática pós-congelação em sêmen caprino. 93p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, 2020.

BATISSACO, L., ARRUDA, R. P., ALVES, M. B. R., TORRES, M. A., LEMES, K. M., PRADO-FILHO, R. R., ALMEIDA, T. G., ANDRADE, A. F. C. & CELEGHINI, E. C. C. (2020). Cholesterol-loaded cyclodextrin is efficient in preserving sperm quality of cryopreserved ram semen with low freezability. *Reprod. Biol.*, 20 (1), 14-24.

CASARES, D.; ESCRIBÁ, P.V.; ROSSELLÓ, C.A. Membrane lipid composition: Effect on membrane and organelle structure, function and compartmentalization and therapeutic avenues. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20, 2167.

CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013). 'Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal'. CBRA: Belo Horizonte, 2013.

GULAYA, N.M.; GOVSEVA, N. M.; GORPYNCHENKO, I. I.; MARGITICH, V.; KLIMASHEVSKY, V. M.; BOYKO, M. I. Phospholipid composition of human sperm and seminal plasma in relation to sperm fertility. **Archives of Andrology**, v.46, n.3, p.169 – 75, 2001.

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

KIERNAN, M., FAHEY, A. G., & FAIR, S. The effect of the in vitro supplementation of exogenous long-chain fatty acids on bovine sperm cell function. *Reproduction, Fertility and Development*, 25(6), 947-954, 2013.

KOGAN, T., DAHAN, D. G., LAOR, R., ARGOV-ARGAMAN, N., ZERON, Y., KOMSKY-ELBAZ, A., KALO, D., & ROTH, Z. (2021). Association between Fatty Acid Composition, Cryotolerance and Fertility Competence of Progressively Motile Bovine Spermatozoa. *Animals*, 11(10), 2948

LEWIS, S. E., & MACCARRONE, M. Endocannabinoids, sperm biology and human fertility. *Pharmacological Research*, 2009. 60(2), 126-131. doi: 10.1016/j.phrs.2009.02.009.

SILVA, C.M.B. Efeito da melatonina em espermatozoides de equino. 2010. 72p. **Tese (Doutorado)**, Universidade Técnica de Lisboa, 2010.

SINGH AK, KAUR H, CHEEMA RS, KUMAR A, HONPARKHE M, SINGH P. Palmitic acid supplementation in tris extender can improve the freezability of buffalo bull semen. *Indian Veterinary Journal*. April 2019;96(4):14-16.

SOUSA FILHO, M.A.C., EVANGELISTA, L.S.M., CASTELO BRANCO, Y.N.T.C., CASTELO BRANCO, M.A., BARROS, F.N., DA SILVA, J.H.L., DE OLIVEIRA, A.M.S., DE SOUSA CAVALCANTE, M.M.A., & TORRES DE SOUZA, J.A. Efeito da adição do ácido palmítico e da vitamina E ao diluidor Tris-gema na criopreservação de sêmen canino. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.1839, n.49, p.1-8, 2021.

TAVILANI, H., DOOSTI, M., NOURMOHAMMADI I., MAHJUB H., VAISIRAYGANI A., S. SALIMI, et al. (2007). Lipid composition of spermatozoa in normozoospermia and asthenozoospermia males. *Prostag Leukotr Ess*, 77, 45 – 50.

VERSTEGEN J, IGUER-OUADA M, ONCLIN K. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* [Internet]. 2002; 57(1):149–79. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11775967>.

WATERHOUSE K.E., HOFMO P.O., TVERDALE A. & MILLER JR. R.R. 2006. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasm membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction*. 131: 887-894. 2006.

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

ZADEH HASHEM, E., HADDAD, R., & ESLAMI, M. Evaluation of ram semen enrichment with oleic acid on different spermatozoa parameters during low temperature liquid storage. *Small Ruminant Research*, 150, 30-39. 2010.

ZHU Z., LI R., FENG C., LIU R., ZHENG Y., HOQUE S.A.M., WU D., LU H., ZHANG T. & ZENG W. 2020. Exogenous oleic acid and palmitic acid improve boar sperm motility via enhancing mitochondrial β -oxidation for ATP generation. **Animals**. 10(591): 1-15.

CAPITULO II

1 **Suplementação do Tris-gema com extrato de Jambolão associado ao ácido**
2 **palmítico na qualidade espermática pós-criopreservação**

3 Marcos Antônio Celestino de Sousa Filho^{1*}, Antônio de Sousa Junior 1

4
5 Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil

6 *Autor correspondente: marcoscelestino90@gmail.com

7
8 **Resumo**

9 Objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação do extrato de jambolão (J-0,1mol)
10 e do ácido palmítico (AP) em diferentes concentrações (100µM e 200µM),
11 adicionados em diluidor Tris-gema, na qualidade seminal pós descongelação. Para
12 tanto, foi realizada a coleta de amostras de sêmen de seis carneiros clinicamente
13 saudáveis da raça Dorper, com parâmetros andrológicos/seminais de acordo com a
14 espécie, segundo o colégio brasileiro de reprodução. O pool das amostras foi diluído
15 em diluidor Tris-gema e dividido em tratamentos: Controle (Tris-gema), T1 (AP-
16 100µM + J-0,1mol), T2 (AP-200µM + J-0,1mol) e T3 (J-0,1mol). As amostras foram
17 criopreservadas pelo método automatizado na curva lenta para ovinos e, após 15
18 dias, foram realizadas análises pós-criopreservação, incluindo o teste de
19 termorresistência (TTR), testes de sondas para integridade da membrana plasmática
20 e atividade mitocondrial, bem como análise computadorizada de espermatozoides
21 (CASA). A análise estatística descritiva foi realizada nos dados usando frequência,
22 média, desvio padrão e testes de normalidade. ANOVA e teste de Kruskal-Wallis
23 foram usados para comparar médias entre os grupos. Teste t pareado e teste de
24 Wilcoxon foram usados para comparar médias antes e após congelação. O teste de
25 Friedman foi utilizado para verificar diferenças entre tempos, seguido de testes post-
26 hoc. Os dados foram analisados no IBM SPSS 20.0, com nível de significância de
27 5% ($p < 0,05$). Os resultados analisados mostraram não haver diferenças
28 significativas entre o grupo controle e os tratamentos para os testes realizados.
29 Conclui-se que a adição de 0,1mol de extrato de jambolão e a associação ao ácido
30 palmítico no Tris-gema não apresentou efeitos significativos na qualidade pós-
31 criopreservação do sêmen ovino.

32
33 **Palavras chave:** Criopreservação, Sêmen, Antioxidantes, Ácido Palmítico, Extrato
34 de Jambolão

35 **Introdução**

36 Durante o processo de criopreservação do sêmen, há uma produção excessiva
37 de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que resulta na diminuição da
38 concentração intracelular de antioxidantes presentes no plasma seminal e pode levar
39 à redução da eficiência reprodutiva em diversas espécies animais (AGARWAL et al.,
40 2003). O sistema antioxidante endógeno nos espermatozoides pode não ser
41 suficiente na prevenção da peroxidação lipídica durante o processo de
42 criopreservação do sêmen. Por isso, várias pesquisas têm sido feitas para
43 enriquecer o sêmen através da adição de substâncias antioxidantes naturais ou
44 sintéticas (HASHIM; ESLAMI, 2016).

45 Estudos recentes utilizando o extrato da polpa do jambolão indicam que a
46 adição desse extrato ao diluidor seminal pode melhorar significativamente vários
47 parâmetros de qualidade do sêmen bovino criopreservado. (SULEMAN et al., 2021)

48 Os ácidos graxos têm sido associados positivamente com a regulação da
49 função espermática in vitro. Por exemplo, no sêmen bovino, os ácidos palmítico,
50 esteárico e oléico foram incorporados ao esperma in vitro, onde os ácidos graxos
51 saturados foram associados ao metabolismo energético e, portanto, à motilidade
52 espermática (ORTEGA-FERRUSOLA *et al.*, 2009). No entanto, ainda não existem
53 evidências e estudos relativos à atividade antioxidante do Ácido Palmítico na
54 criopreservação espermática de ovinos.

55 Dessa forma, esse estudo visa avaliar os efeitos da adição do extrato de
56 jambolão e de ácido palmítico ao diluidor Tris-gema, na preservação estrutural
57 espermática após o processo de criopreservação do sêmen ovino.

58

59

60

61 **MATERIAI E MÉTODOS**

62 **Comitê de Ética**

63 Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da
64 Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina - PI, sob protocolo nº 745/2022.

65 **Animais**

66 Foram utilizados seis carneiros da raça Dorper, provenientes do Biotério de
67 Produção de Ovinos do Colégio Técnico de Teresina (CTT) da UFPI, localizado na
68 cidade de Teresina. Os carneiros foram mantidos sob regime semi-intensivo, em
69 área com pastagem cultivada de capim *Tifton* sp. e *Mombaça* sp., dividida em
70 piquetes, com água e sal mineral a vontade, e avaliados quanto à normalidade dos
71 parâmetros andrológicos antes do estudo, de acordo com as recomendações do
72 Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (motilidade em massa: ≥ 3 ; motilidade
73 espermática: $\geq 80\%$; vigor: ≥ 3 ; concentração: 1 a 3 bilhões espermatozoides/mL;
74 número total de espermatozoides no ejaculado: 3 a 5 bilhões; espermatozoides
75 morfolologicamente normais: $\geq 80\%$ (CBRA, 2013).

76 **Coleta e diluição do sêmen**

77 Foram realizadas seis coletas de sêmen dos seis reprodutores por semana,
78 totalizando 36 ejaculados. Após cada etapa que se seguiu para a formação dos
79 grupos experimentais o material foi analisado e selecionado conforme as
80 características seminais desejáveis de reprodutores ovinos (CBRA, 2013).
81 Posteriormente a formação do *pool* do ejaculado dos seis reprodutores o material foi
82 diluído em diluidor Tris-gema (3,605 g de Tris; 2,024 g de ácido cítrico; 1,488g de
83 frutose; 25 mg de gentamicina; 50.000 UI de penicilina; 100 ml de água destilada;
84 20% de gema de ovo e 5% de glicerol, com osmolaridade de 350 mOsm/kg e pH
85 6,8). Quatro diluidores experimentais foram preparados na seguinte disposição:

86 Controle (Tris-gema), T1 (Tris-gema + 100 μ M/ml de Ácido Palmítico; Sigma-
87 Aldrich®, St.Louis, MO, USA + 0,1 mol de Extrato de Jambolão), T2 (Tris-gema +
88 200 μ M/ml de Ácido Palmítico + 0,1 mol de Extrato de Jambolão) e T3 (Tris-gema +
89 0,1 mol de Extrato de Jambolão).

90 **Criopreservação do Sêmen**

91 Imediatamente após a coleta e processamento, as amostras de sêmen
92 foram envasadas em palhetas de 0,25mL, à temperatura ambiente, para uma
93 concentração final de 20×10^6 espermatozoides viáveis/palheta, e então foram
94 congeladas em máquina automática em curva lenta para ovinos a uma taxa de
95 resfriamento de $-0,5$ °C/min da temperatura ambiente (25 °C) até atingir a
96 temperatura de 5 °C. Após estabilização a 5 °C por 1 hora, o congelamento foi
97 realizado a -20 °C/min até atingir uma temperatura de -120 °C, quando as palhetas
98 foram colocadas diretamente em nitrogênio líquido (-196 °C), e armazenadas até o
99 tempo de análise pós-criopreservação. A descongelação foi realizada após 15 dias
100 da última coleta, em banho-maria, em uma temperatura de 37 °C por 30 segundos,
101 para avaliação quanto à motilidade total e vigor no teste de termo resistência (TTR)
102 lento, integridade da membrana plasmática, atividade mitocondrial, através de
103 sondas fluorescentes.

104 **Teste de Termorresistência (TTR)**

105 O teste de termorresistência avaliou a longevidade dos espermatozoides das
106 amostras de sêmen descongeladas, incubadas em banho-maria a 37 °C por um
107 período de 3 horas. As amostras descongeladas foram acondicionadas em
108 microtubos de 1,5 mL e incubadas a 37 °C, posteriormente, foram avaliadas quanto
109 à motilidade total (MT - %) e o vigor (1-5) espermático por meio de microscopia de
110 contraste de fase (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão) com placa aquecedora

111 acoplada, com aumento de 400x, nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos pós-
112 descongelamento de acordo com Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA,
113 2013).

114 **Análise computadorizada**

115 A cinemática espermática foi avaliada por meio de um Sistema de Análises de
116 espermatozoide Computadorizado (CASA). O CASA consistiu de um sistema de
117 microscopia óptica de contraste de fase (Nikon TM H5505, Eclipse 50i, Japão), com
118 iluminação estroboscópica, e uma fase quente a 37°C, uma câmera de vídeo (Basler
119 Visão Technologie TM 166 A312FC, Ahrensburg, Alemanha) e um PC com o
120 analisador de esperma Classe TM software (Microptics, SL, versão 3.2.0, Barcelona,
121 Espanha). As variáveis avaliadas foram: motilidade total (MOT - $\mu\text{m/s}$) motilidade
122 progressiva (MOP - $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL - $\mu\text{m/s}$), velocidade em linha
123 reta (VSL - $\mu\text{m/s}$), velocidade média do percurso (VAP - $\mu\text{m/s}$), linearidade (LIN - %),
124 retilinearidade (STR-%), deslocamento lateral de cabeça (ALH - μm), Wobble (WOB
125 - %) e frequência de batimento cruzado (BCF-Hz), para cada espermatozoide
126 analisado.

127 **Análise da integridade da membrana plasmática**

128 Para avaliação da integridade da membrana plasmática, foi utilizado o método
129 de coloração dupla com diacetato de carboxifluoresceína (DCF; Sigma-Aldrich®,
130 St.Louis, MO, USA) e iodeto de propídio (IP; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA),
131 modificado por Coletto *et al.* (2002), em que alíquotas de 50 μL de sêmen pós-
132 descongelamento foram diluídas em 150 μL de Tris (3,605 g de Tris, 2,024 g de ácido
133 cítrico, 1,488 g de frutose, 100 mL de água destilada) contendo 5 μL de DCF
134 (0,46mg/mL em DMSO) e 20 μL de IP (0,5 mg/mL em PBS) e incubadas por 10
135 minutos a 37 °C. Um total de 200 espermatozoides foi avaliado em microscópio de

136 epifluorescência (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão), com aumento de 400x,
137 usando-se filtro de emissão DBP 580-630nm e excitação DBP 485/20nm. Os
138 espermatozoides foram classificados com membrana intacta, quando se
139 apresentaram corados em verde, e com membrana danificada quando corados em
140 vermelho.

141 **Análise do potencial de membrana mitocondrial**

142 A função mitocondrial foi determinada pela utilização de um fluorocromo
143 catiônico lipofílico JC-1 (Guthrie e Welch, 2006). Para tanto, alíquotas de 50µL de
144 sêmen pós-descongelamento foram diluídas em 150 µL de Tris, contendo 5 µL de JC-1
145 (0,15mM em DMSO) e incubadas por 10 minutos a 37 °C. Um total de 200
146 espermatozoides foram avaliados em microscópio de epifluorescência (Olympus
147 optical Co., Ltda., Tóquio, Japão), com aumento de 1000 x, sob óleo de imersão,
148 usando-se filtro de emissão LP 515nm e BP 450-490 nm para excitação. Os
149 espermatozoides com a região da peça intermediária coradas em laranja foram
150 classificados com alto potencial de membrana mitocondrial, e aqueles com a região
151 da peça intermediária coradas em verde foram classificados com baixo potencial de
152 membrana mitocondrial.

153 **Análise Estatística**

154 Para análise dos dados foram utilizados os procedimentos usuais da estatística
155 descritiva, tais como distribuição de frequência absoluta (n) e relativa (%) média e
156 desvio padrão, bem como o teste Shapiro-Wilk para verificar se os dados seguiram
157 distribuição Normal. Utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA) e o teste não
158 paramétrico H de Kruskal-Wallis para verificar diferença das médias entre os grupos.

159 Para comparação de médias antes e pós congelamento foi usado o teste não
160 paramétrico de Wilcoxon. Para verificar diferença entre os tempos foi usado o teste

161 não-paramétrico de Friedman e em seguida foi aplicado o *post-hoc* para verificar
 162 diferenças em pares. Os dados foram digitados no Excel e analisados no programa
 163 *IBM Statistical Package for the Social Sciences versão 20.0*. O nível de significância
 164 adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

165 Resultados

166 Durante o teste de termorresistência (TTR) espermático a 37°C, realizado nos
 167 tempos 0, 60, 120 e 180 minutos após a descongelação do sêmen, não foram
 168 encontradas diferenças significativas nos valores de motilidade e vigor entre os
 169 tratamentos ($p > 0,05$).

170 **Tabela 1.** Motilidade total (%) e vigor de espermatozoides ovinos, criopreservados em diluidor Tris-
 171 gema, com e sem suplementação, avaliados pelo teste de termo resistência (TTR).

	Grupo				p-valor ²
	Controle	T1	T2	T3	
TTR Motilidade					
0	29,17 ± 8,01 ^a	30,00 ± 7,07 ^a	31,67 ± 6,83 ^a	33,33 ± 9,83 ^a	0,870
60 min	15,00 ± 7,75 ^{ab}	16,67 ± 6,06 ^b	18,33 ± 2,58 ^{bc}	20,00 ± 6,32 ^{ab}	0,847
120 min	5,00 ± 5,48 ^{bc}	11,67 ± 2,58 ^{bc}	9,00 ± 5,87 ^{bc}	12,17 ± 6,65 ^{bc}	0,148
180 min	0,83 ± 2,04 ^c	1,33 ± 2,16 ^c	0,50 ± 1,22 ^c	2,67 ± 2,25 ^c	0,243
p-valor ¹	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
TRR Vigor					
0	2,50 ± 0,55 ^a	2,50 ± 0,55 ^a	2,50 ± 0,55 ^a	2,67 ± 0,52 ^a	0,776
60 min	1,83 ± 0,75 ^{ab}	2,17 ± 0,75 ^{ab}	2,00 ± 0,00 ^a	2,33 ± 0,52 ^{ab}	0,492
120 min	0,67 ± 0,52 ^c	1,33 ± 0,52 ^{bc}	1,33 ± 0,52 ^{bc}	1,67 ± 0,82 ^{abc}	0,081
180 min	0,17 ± 0,41 ^c	0,33 ± 0,52 ^c	0,17 ± 0,41 ^c	0,83 ± 0,75 ^c	0,183
p-valor ¹	<0,001	<0,001	<0,001	0,002	

172 Letras iguais não diferem entre si. Legenda: TTR = Teste de Termo Resistência, T1 = (Tris-gema +
 173 100 µM/ml de Ácido Palmítico + 0,1 mol de Extrato de Jambolão), T2 (Tris-gema + 200 µM/ml de
 174 Ácido Palmítico + 0,1 mol de Extrato de Jambolão) e T3 (Tris-gema + 0,1 mol de Extrato de
 175 Jambolão) ; ¹Friedman; ²Kruskal-Wallis

176

177

178 No contexto da Tabela 1, é relevante destacar que o vigor espermático
 179 apresentou estabilidade ao longo do tempo, do momento 0 ao 120 minutos, no grupo
 180 T3, sem evidenciar diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$). Da mesma
 181 forma, os parâmetros de motilidade espermática desse grupo não mostraram
 182 diferenças significativas até o tempo de **120** minutos, em contraste com os demais
 183 grupos.

184 Durante as análises de integridade da membrana plasmática utilizando sondas

185 fluorescentes, foi observado que a adição do ácido palmítico e do extrato de
 186 jambolão ao diluidor não apresentaram uma resposta significativa na preservação da
 187 estrutura em relação ao grupo controle, apesar de (Tabela 2; $p > 0,05$).

188 Para a análise do potencial mitocondrial também não houve diferença
 189 estatística para os valores encontrados nos diferentes grupos experimentais para o
 190 grupo controle (Tabela 2; $p > 0,05$).

191 **Tabela 2.** Integridade da membrana plasmática (IMP), atividade mitocondrial (AM) pós-
 192 descongelamento de espermatozoides ovinos, criopreservados em diluidor Tris-gema, com e sem
 193 suplementação.

Variáveis	Grupo				p-valor
	Controle	T1	T2	T3	
IMP (%)	41,67 ± 9,73	63,50 ± 18,56	63,33 ± 12,60	55,33 ± 15,81	0,056 ¹
AM (%)	58,83 ± 21,57	69,50 ± 20,34	49,33 ± 26,53	73,00 ± 12,57	0,310 ¹

194 Letras iguais não diferem entre si. Legenda: IMP = Valor de membrana plasmática intacta, AM = Valor
 195 de mitocôndria intacta, T1 = (Tris-gema + 100 µM/ml de Ácido Palmítico + 0,1 mol de Extrato de
 196 Jambolão), T2 (Tris-gema + 200 µM/ml de Ácido Palmítico + 0,1 mol de Extrato de Jambolão) e T3
 197 (Tris-gema + 0,1 mol de Extrato de Jambolão), ¹ANOVA.

198

199 **Tabela 3.** Parâmetros da cinética espermática pelo CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) de
 200 espermatozoides ovinos criopreservados após suplementação em diferentes concentrações de ácido
 201 palmítico no diluidor Tris-gema.

Variáveis	Grupo				p-valor
	Controle	T1	T2	T3	
MP	20,82 ± 10,77	21,20 ± 7,09	17,93 ± 5,17	15,17 ± 3,10	0,440 ¹
MT	51,67 ± 13,74	55,13 ± 12,43	51,25 ± 8,16	48,40 ± 14,82	0,832 ¹
VCL	61,22 ± 10,42	59,47 ± 4,85	58,97 ± 5,62	58,27 ± 2,81	0,880 ¹
VSL	33,88 ± 11,09	36,52 ± 5,42	34,30 ± 5,86	33,07 ± 5,98	0,871 ¹
VAP	42,65 ± 10,96	45,00 ± 5,04	42,48 ± 5,18	41,65 ± 5,19	0,861 ¹
LIN	54,23 ± 9,01	61,15 ± 4,88	57,85 ± 4,55	56,50 ± 7,62	0,375 ¹
STR	78,23 ± 7,01	80,85 ± 3,42	80,33 ± 3,81	78,98 ± 4,43	0,778 ¹
WOB	68,98 ± 6,44	75,52 ± 3,43	71,95 ± 2,46	71,33 ± 5,99	0,172 ¹
ALH	3,18 ± 0,44 ^a	2,62 ± 0,28 ^b	2,82 ± 0,10 ^{ab}	2,77 ± 0,30 ^{ab}	0,027¹
BCF	9,60 ± 1,76	8,27 ± 0,98	9,57 ± 0,38	8,93 ± 1,81	0,310 ¹

202 Letras iguais não diferem entre si. Legenda: MP = Motilidade progressiva, MT = Motilidade total, VCL
 203 = Velocidade curvilínea, VSL = Velocidade em linha reta, VAP = Velocidade média na passagem, LIN
 204 = Linearidade, STR = Retidão, WOB = Oscilação, ALH = Deslocamento de cabeça, BCF = Frequência
 205 dos batimentos, T1 = (Tris-gema + 100 µM/ml de Ácido Palmítico + 0,1 mol de Extrato de Jambolão),
 206 T2 (Tris-gema + 200 µM/ml de Ácido Palmítico + 0,1 mol de Extrato de Jambolão) e T3 (Tris-gema +
 207 0,1 mol de Extrato de Jambolão). ¹ANOVA.

208 A partir da análise da Tabela 3, que avalia os parâmetros cinéticos após a
 209 descongelamento nos diferentes grupos, pode-se observar que a adição de ácido

210 palmítico e/ou extrato de jambolão ao diluidor seminal não apresentou interferência
211 significativa ($p>0,05$) na maioria dos parâmetros observados em comparação com o
212 grupo controle. No entanto, houve uma exceção no parâmetro ALH, no qual o grupo
213 controle demonstrou um valor significativamente maior em relação aos demais
214 grupos ($p<0,05$).

215 **Discussão**

216
217 O teste de termorresistência (TTR) é uma técnica utilizada para selecionar
218 amostras de sêmen mais resistentes a lesões causadas pelo calor e aumentar a
219 sobrevivência espermática dentro do trato reprodutivo feminino. No entanto, estudos
220 demonstram que não há correlação positiva entre a qualidade dos espermatozoides
221 ao final da TTR e fertilidade. Em uma pesquisa realizada por Vianna et al. (2009), foi
222 verificado que espermatozoides com taxa de motilidade de 0% após 5 horas de
223 incubação a 38°C apresentaram taxa de prenhez de 66% na IATF.

224 No presente estudo, durante o TTR espermático a 37°C, não foram
225 encontradas diferenças significativas na motilidade entre os tratamentos ($p>0,05$)
226 nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos após a descongelação do sêmen. Os
227 resultados apresentados na Tabela 1 referentes à motilidade pós-criopreservação
228 indicam que a adição do ácido palmítico em conjunto com o extrato de jambolão ao
229 diluente seminal não teve um efeito agregador significativo ($p>0,05$).

230 Após realizar a análise de Friedman para comparar as motilidades dentro de
231 cada grupo demonstrou que os grupos, controle e T3, apresentaram uma maior
232 manutenção da motilidade espermática na primeira hora de análise ($p>0,05$).

233 Para Silva et al. (2007), os antioxidantes funcionam como agentes protetores
234 impedindo a formação das ROS e prevenindo o aparecimento de danos oxidativos
235 nos espermatozóides, com conseqüente preservação de motilidade, vigor,

236 integridade de DNA e das membranas espermáticas, evitando a ocorrência de
237 reação acrossomal precoce.

238 Estudos recentes têm investigado a presença de ácidos graxos em
239 espermatozoides bovinos frescos e congelados e têm demonstrado que os ácidos
240 graxos saturados são os mais abundantes em espermatozoides descongelados
241 vivos, mas essas células apresentam baixa motilidade progressiva (KOGAN T. et al.,
242 2021). Isso sugere que a presença de ácidos graxos saturados, como o ácido
243 palmítico, pode ter um efeito negativo na motilidade dos espermatozoides, o que
244 pode ter interferido nas respostas dos grupos T1 e T2.

245 Os valores obtidos por Silva et al. (2018) foram inferiores aos valores
246 encontrados neste estudo e abaixo dos valores recomendados pelo Colégio
247 Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Em outra pesquisa realizada por
248 Suleman et al. (2021), extrato de jambolão foi utilizado em duas concentrações
249 (7ppm e 14ppm) para avaliar seu efeito no sêmen bovino submetido à
250 criopreservação. Os resultados mostraram uma melhora na motilidade espermática
251 em ambos os tratamentos suplementados quando comparados ao grupo controle.

252 O vigor espermático é uma característica que descreve a qualidade da
253 motilidade espermática (SILVA *et al.*, 2011). Essa propriedade é crucial para a
254 fertilização bem-sucedida do óvulo e o desenvolvimento embrionário adequado. No
255 contexto da criopreservação de sêmen, é fundamental preservar essa característica,
256 a fim de garantir que os espermatozoides congelados possuam uma alta capacidade
257 de movimentação e possam ser utilizados para a reprodução (LIMA, 2010).

258 Na Tabela 1, pode-se observar que no grupo T3 os valores de vigor
259 espermático foram mantidos sem diferenças significativas até o tempo de 120
260 minutos após a descongelação ($p>0,05$), demonstrando que a adição do extrato de

261 jambolão ao diluidor seminal pode contribuir para a preservação dessas
262 propriedades cinéticas dos espermatozoides durante o processo de criopreservação.

263 O vigor espermático está diretamente relacionado com a formação de ATP nas
264 mitocôndrias que se localizam na peça intermediária do espermatozoide e são as
265 principais responsáveis pela produção de energia, que é obtida por meio da
266 metabolização da glicose (BRITO et al., 2007). O extrato do jambolão é proveniente
267 do mesocarpo da fruta, ele é composto por lipídios, proteínas, carboidratos e
268 açúcares, fatores que podem servir como fonte de energia para as células
269 espermáticas (BALIGA et al., 2011).

270 Quando os espermatozoides são expostos ao processo de criopreservação
271 eles sofrem várias alterações negativas como uma redução de motilidade
272 espermática, diminuição da integridade acrossomal, integridade da membrana
273 plasmática, viabilidade espermática, acarretando no prejuízo a viabilidade
274 espermática e na capacidade fecundante em função da peroxidação lipídica gerada
275 pelas ROS (BALL, 2008).

276 Com base nos resultados apresentados na Tabela 2, na avaliação da
277 integridade da membrana plasmática e atividade mitocondrial, observou-se que os
278 tratamentos testados apresentaram porcentagens superiores de membranas intactas
279 em comparação com o grupo controle, porém sem diferenças significativas ($p > 0,05$).
280 Esse fato pode ser atribuído ao desvio padrão elevado observado nos tratamentos
281 com antioxidantes.

282 Pesquisas constataram que a membrana plasmática e a membrana
283 acrossomal são de grande importância para inúmeros processos, incluindo os de
284 capacitação espermática e reação acrossomal, fundamentais para fertilização, sendo
285 ainda, a membrana plasmática responsável pela conservação da homeostase celular

286 (CAMPANHOLI et al., 2017).

287 Contrários aos nossos resultados, estudos realizados por Ramos (2012)
288 verificaram que a adição de antocianinas ao diluidor seminal caprino contrinuiu para
289 melhorar a preservação da integridade das membranas dos espermatozoides
290 congelados. Resultados encontrados por Sousa Filho et al., (2021) defendem adição
291 de ácido palmítico na concentração de 100µM ao diluidor Tris-gema foi capaz de
292 preservar a integridade da membrana plasmática de espermatozoides caninos
293 durante o processo de criopreservação do sêmen.

294 Outra importante avaliação é a dinâmica da motilidade oferecida pelo
295 sistema CASA, fornecendo informações úteis para a determinação da qualidade
296 seminal antes e após a criopreservação. A avaliação pelo programa CASA é um
297 importante indicador da qualidade espermática, com aferições mais objetivas e
298 precisas dos parâmetros cinéticos espermáticos, realizando avaliações múltiplas
299 e repetidas, nas quais estão relacionadas diretamente com a fertilidade
300 espermática (GUARDIEIRO, 2013).

301 Conforme a tabela 3, que avalia os parâmetros cinéticos pós-
302 criopreservação nos diferentes grupos, pode-se observar que a adição dos
303 antioxidantes ao diluidor seminal não interferiu significativamente ($p>0,05$) na
304 maioria dos parâmetros observados, em relação ao grupo controle, com exceção do
305 parâmetro ALH onde o grupo controle apresentou valor significativamente maior que
306 os demais grupos ($p<0,05$).

307 A amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH - µm) é a amplitude do
308 deslocamento médio da cabeça do espermatozóide em sua trajetória real. A
309 mensuração desse parâmetro esta relacionada com a capacidade de penetração na
310 zona pelúcida do óvulo, assim, a ALH é um dos parâmetros que tem efeito sobre a

311 fertilização (MATOS et al., 2008). Apesar do valor de ALH apresentar-se maior no
312 grupo controle, os outros grupos apresentaram valores dentro do preconizado para a
313 espécie ovina, segundo Palacín et al. (2013).

314 Esses resultados são particularmente relevantes para a indústria da
315 reprodução animal, que depende da criopreservação do sêmen como uma forma de
316 preservar as linhagens genéticas de animais de alto valor comercial. A utilização de
317 antioxidantes no diluidor seminal é uma estratégia promissora para melhorar a
318 qualidade das amostras de sêmen congelado e aumentar as taxas de sucesso da
319 fertilização in vitro.

320 Portanto, os resultados deste estudo reforçam a importância do uso de extratos
321 de plantas com propriedades antioxidantes, como o extrato de jambolão para
322 preservar as características de motilidade e vigor espermático em amostras de
323 sêmen de ovinos congeladas. Essa abordagem pode contribuir significativamente
324 para melhorar a eficiência dos programas de reprodução animal e garantir a
325 produção de animais de alta qualidade genética.

326 **Conclusão**

327 Conclui-se que a adição de 0,1mol de extrato de jambolão e a associação ao
328 ácido palmítico no Tris-gema não apresentou efeitos significativos na qualidade pós-
329 criopreservação do sêmen ovino.

330 **Agradecimentos**

331 Agradecimentos são devidos ao biotério de produção de ovinos do Colégio
332 Técnico de Teresina (CTT) da Universidade Federal do Piauí (UFPI) pela provisão
333 dos animais utilizados neste estudo, bem como ao laboratório de Biotecnologia da
334 Reprodução Animal da UFPI por fornecer as instalações necessárias para as
335 análises pós-descongelamento das amostras. Também expressamos nossa gratidão à
336 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela

337 concessão de uma bolsa de estudos que tornou este trabalho possível.

338

339 Referencias

340

341 AGARWAL A, SALEH RA, BEDAIWY MA. Role of reactive oxygen species in the
342 pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*. 2003;79(4):829–43.

343

344 BALL, B. A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm
345 function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, v.107, n.3,
346 p.257-267, 2008.

347

348 CAMPANHOLI, S. P.; MONTEIRO, F. M.; DIAS, E. A. R.; MERCADANTE, M. E. Z.;
349 PAZ, C. C. P DE.; DELL'AQUA JUNIOR, J. A.; PAPA, F. O.; DELL'AQUA, C. DE P.
350 F.; VANTINI, R.; GARCIA, J. M. Effect of seminal plasma removal before
351 cryopreservation of bovine semen obtained by electroejaculation on semen quality
352 and in vitro fertility. **Theriogenology**, v.89, p.114-121, 2017.

353

354 CHHIKARA, N., KAUR, R., JAGLAN, S., SHARMA, P., ET AL. (2019). Bioactive
355 Compounds and Pharmacological and Food Applications of *Syzygium cumini* – A
356 Review. *The Royal Society of Chemistry*, 9(12), 6096-6115.

357

358 DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M.
359 Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema beta-caroteno/ácido linoléico e
360 método de seqüestro de radicais DPPH. **Food Science and Technology**, v. 26, p.
361 446-452, 2006.

362

363 HASHEM, E. Z.; ESLAMI, M. Kinetin improves motility, viability and antioxidative
364 parameters of ram semen during storage at refrigerator temperature. *Cell and Tissue*
365 *Banking*, p.1-15, 2016.

366

367 JAGETIA, G. C. (2017). Phytochemical Composition and Pleotropic Pharmacological
368 Properties of Jamun, *Syzygium Cumini* Skeels. *Journal of Exploratory Research in*
369 *Pharmacology*, 2(2), 54-66.

370

371 KIERNAN, M., FAHEY, A. G., & FAIR, S. The effect of the in vitro supplementation of
372 exogenous long-chain fatty acids on bovine sperm cell function. *Reproduction,*
373 *Fertility and Development*, 25(6), 947-954, 2013.

374

375 KOGAN, T., DAHAN, D. G., LAOR, R., ARGOV-ARGAMAN, N., ZERON, Y.,
376 KOMSKY-ELBAZ, A., KALO, D., & ROTH, Z. (2021). Association between Fatty Acid
377 Composition, Cryotolerance and Fertility Competence of Progressively Motile Bovine
378 Spermatozoa. *Animals*, 11(10), 2948

379

380 KSHIRSAGAR RB, DESAI GB, SAWATE AR, DESHMUKH NM. Physico-chemical
381 and nutritional properties of jamun (*Syzygium cumini*) seed. *Journal of*
382 *Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2019;8(2):211-213

383

384 LIMA, F. R. G. (2010). Pesquisa de novo método de congelação para sêmen de

- 385 ovinos Santa Inês. Tese de doutorado - Universidade Federal do Ceará, Centro de
386 Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em
387 Zootecnia, Fortaleza.
388
- 389 ORTEGA FERRUSOLA, C.; GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, L.; SALAZAR SANDOVAL,
390 C.; MACÍAS GARCÍA, B.; RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, H.; TAPIA, J.A.; PEÑA, F.J.
391 Inhibition of the mitochondrial permeability transition pore reduces “apoptosis like”
392 changes during cryopreservation of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.74,
393 p.458–465, 2010.
394
- 395 SILVA R. C. B. **Caracterização genética de populações ovinas nativas do**
396 **nordeste brasileiro**. 2007. 92f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Universidade
397 Federal Rural do Pernambuco, 2007.
398
- 399 SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células
400 espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de**
401 **Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, p. 370-384, 2011.
402
- 403 SOUSA FILHO, M.A.C., EVANGELISTA, L.S.M., CASTELO BRANCO, Y.N.T.C.,
404 CASTELO BRANCO, M.A., BARROS, F.N., DA SILVA, J.H.L., DE OLIVEIRA,
405 A.M.S., DE SOUSA CAVALCANTE, M.M.A., & TORRES DE SOUZA, J.A. Efeito da
406 adição do ácido palmítico e da vitamina E ao diluidor Tris-gema na criopreservação
407 de sêmen canino. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.1839, n.49, p.1-8, 2021.
408
- 409 SULEMAN, S.; KANWAL, M. A.; MALIK, F.; ALI, R.; SIDDIQUE, S.; KANWAL, N.;
410 AHMAD, S. N.; YOUNIS, A.; HUSSAIN, I.; AHMAD, K. R. Jambul (*Syzygium cumini*)
411 Pulp Extract Enhances Viability, Motility, and in vitro Fertilizability of Cryopreserved
412 Bovine Semen. **Biopreservation and Biobanking**, v. 19, n. 1, p. 53-59, 2021.
413
- 414 VIANNA, F.P., PAPA, F.O., ZAHN, F.S., MELO, C.M., & DELL’AQUA JR, J. A.
415 (2009). 532 Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for
416 cryopreserved 533 bull semen. *Animal Reproduction Science*, 113, 279–282.
417
- 418 RAMOS, Priscilla do Carmo de Azevedo. Uso de antocianina na criopreservação de
419 sêmen caprino. 2012. 39f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) -
420 Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2012.
421

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a conclusão da pesquisa, observou-se que as concentrações utilizadas tanto do ácido palmítico como do extrato de jambolão foram capazes de preservar a integridade morfológica das células espermáticas após o processo de criopreservação, sem causar efeitos adversos. Em relação aos resultados do experimento I e II, verificou-se que o ácido palmítico apresentou resultados mais favoráveis quando adicionado sem a associação de outro antioxidante. Recomenda-se a realização de estudos futuros utilizando concentrações mais elevadas desse ácido.

No experimento II, embora o extrato de jambolão não tenha demonstrado respostas significativas nesta pesquisa, sugere-se a condução de pesquisas adicionais com diferentes concentrações do extrato, a fim de explorar seu potencial para melhorar a qualidade do sêmen criopreservado.

De maneira geral, os resultados da suplementação do diluidor Tris-gema com a associação do ácido palmítico e extrato de jambolão apresentaram tendências promissoras, justificando a necessidade de novas pesquisas para determinar a concentração ideal e investigar seus possíveis efeitos na criopreservação do sêmen ovino.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLUWALIA, B.; HOLMAN, R. T. Fatty acid composition of lipids of bull, boar, rabbit and human semen. **J. Reprod. Fert.** V. 18, p. 431-437, 1969.
- AITKEN, R. J. AND M. A. BAKER, 2006: Oxidative stress, sperm survival and fertility control. **Molecular and cellular endocrinology**, 250, 66–69.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., & ROBERTS, K. W. P. *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre: Artmerd. Editor. 2010.
- AMANN, R.P.; KARTZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v.25, p.317-325, 2004.
- AMIRIDIS, G. S.; CSEH, S. management of small ruminants. 2012. Assisted reproductive technologies in the reproductive **Animal reproduction science**, v. 130, n. 3-4, p. 152-161.
- ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B.; LAUGHTON, M. J.; QUINLAN, G. J.; GUTTERIDGE, J. M. The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron(II)-iron(III) complex. **The Biochemical Journal**, v. 258, n. 2, p. 617-620, 1989.
- BARROS, M. H. C.; SHIOMI, H. H.; AMORIM, L. S.; SIQUEIRA, J. B.; PINHO, R. O.; LIMA, D. M. A.; LOPES, P. S.; GUIMARÃES, S. E. F.; GUIMARÃES, J. D. Viabilidade espermática do sêmen congelado de suínos da raça piau avaliada pelo teste de termorresistência. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.7, n.2, p. 164-170, 2013.
- BALL, B. A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, v.107, n.3, p.257-267, 2008.
- BANDAY, M. N.; LONE, F. A.; RASOOL, F.; RASHID, M.; SHIKARI, A. (2017). Use of antioxidants reduce lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its cryopreservation. **Cryobiology**, v. 74. p. 25-30, 2017.
- BARRERA, G.; PIZZIMENTI, S.; DAGA, M.; DIANZANI, C.; ARCARO, A.; CETRANGOLO, G. P.; GIORDANO, G.; CUCCI, M. A.; GRAF, M.; GENTILE, F. Lipid peroxidation-derived aldehydes, 4-hydroxynonenal and malondialdehyde in aging-related disorders. **Antioxidants**, v. 7, n. 8, p. 102, 2018.
- BLOM, E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. Nordisk **Veterinaermedicin**, v.25, p.383-391, 1973.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal Lipid Peroxidation. **Methods in Enzymology**, 52, 302-10, 1978.

CÂMARA, T. S.; NUNES, T. G. P.; TONIOLLI, R. Diluentes seminais para pequenos ruminantes.

Ciência Animal, v. 28, n. 2, p. 67-83, 2018.

CASTELO BRANCO, M. A.; CASTELO BRANCO, Y. N. T. C.; MORAES JUNIOR, F. J.; BARROS, F. N.; BARÇANTE, F. P. S.; CARVALHO, G. M. C.; EVANGELISTA, L. S. M.; ABREU-

SILVA, A. L.; SOUSA FILHO, M. A.; SOUZA, J. A. T. Plasminogen activator inhibitor and antipain preserve acrosome integrity of bovine spermatozoa during cryopreservation. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 5, 2017.

CASTELO BRANCO, Y. N. T. C. Efeito da suplementação dos ácidos oleico e palmítico e do eugenol na criopreservação de sêmen bovino. 2018. 110f. **Tese** (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2018.

CASTELO, T. S.; FROTA, T. R.; SILVA, A. R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 2, p. 67-75, 2008.

CAVALCANTE, J. M. M.; BRASIL, O. O.; DE MELLO SALGUEIRO, C. C.; SALMITO-VANDERLEY, C. B. S.; NUNES, J. F. Criopreservação do semen ovino em meio diluente á base de água de coco em pó (ACP-102c). **Ciência Animal Brasileira**, v.15, n.3, p. 344-353, 2014.

CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013). 'Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal'. CBRA: Belo Horizonte, 2013.

NAYARA OLIVEIRA DA CRUZ (2022). Biotecnologias para avaliação da viabilidade de criopreservação de gametas do coral endêmico *mussismilia harttii*(verrill, 1868) [Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul]

CHENOWETH P, LORTON S. Animal Andrology: Theories and Applications. 1a. CAB international. USA; 2014. 584 p

COLETO, Z. F.; GUERRA, M. M. P.; BATISTA, A. M. Avaliação do sêmen congelado de caprinos com drogas fluorescentes. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, 24, 101-104, 2002.

CUNNINGHAM, J. Tratado de fisiologia veterinária. **Elsevier Health Sciences**, 2011.

DAS, S.; SARMA, G. Study of The Hepatoprotective Activity of The Ethanolic Extract Of The Pulp Of Eugenia Jambolana (Jamun) In Albino Rats. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 3, p.1466-1474, 2009.

DARBANDI, M.; DARBANDI, S.; AGARWAL, A.; BASKARAN, S.; DUTTA, S.; KHORSHID, H. R. K.; ESTEVES, S.; GILANY, K.; HEDAYATI, M.; NOBAKHT, F.; AKHONDI, M. M.; LAKPOUR, N.; SADEGHI, M. R. Reactive oxygen species-induced alterations in H19-Igf2 methylation patterns, seminal plasma metabolites,

and semen quality. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.36, n.2, p. 241-253, 2019.

DIAS, B. F. Utilização do jambolão (*syzygium cumini*) e da palha de milho roxo (*zea mayz* l.) no desenvolvimento de novos produtos. 2017. 204f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia (EA), Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Goiânia, 2017.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radical Biology and medicine*, v.14, p.255-265, 1993.

DOBRAKOWSKI, M.; KASPERCZYK, S.; HORAK, S.; CHYRA-JACH, D.; BIRKNER, E.; KASPERCZYK, A. Oxidative stress and motility impairment in the semen of fertile males. **Andrologia**, v. 49, n. 10, p. e12783, 2017.

DONADIO, L. C. Dicionário das frutas. Jaboticabal, 2007. 300 p.

DRUART, X.; RICKARD, J. P.; MACTIER, S.; KOHNKE, P. L.; KERSHAW-YOUNG, C. M.; BATHGATE, R.; GIBB, Z.; CROSSETT, B.; TSIKIS, G.; LABAS, V.; HARICHAUX, V.; GRUPEN, C.G. Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. **Journal of proteomics**, v.91, p.13-22, 2013.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema beta-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Food Science and Technology**, v. 26, p. 446-452, 2006.

FARIA, A. F.; MARQUES, M. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. **Food Chemistry**, v.126, p.1571-1578, 2011.

FIGUEIREDO, J. R. Bioética: Repensando o uso das biotécnicas reprodutivas. **Ciência veterinária nos trópicos**, v. 11, 2008.

FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A.; ROVAY, H.; BORGES, A. M.; BARBOSA, L. P.; MAFFILI, V. V.; FRAGA, D. B. M. Hypoosmotic swelling test in goat spermatozoa. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, p. 436-457, 2001.

GATTI, J.L.; CASTELLA, S.; DACHEUX, F.; ECROYD, H.; MÉTAYER, S.; THIMON, V. AND DACHEUX, J.L. Post-testicular sperm environment and fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 321–339, 2004.

GRAHAM, J. K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v.64, p.492-504, 2005.

GULAYA, N.M.; GOVSEVA, N. M.; GORPYNCHENKO, I. I.; MARGITICH, V.; KLIMASHEVSKY, V. M.; BOYKO, M. I. Phospholipid composition of human sperm and seminal plasma in relation to sperm fertility. **Archives of Andrology**, v. 46, n. 3,

p. 169 – 75, 2001.

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

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004.

HAMES, B.; N. HOOPER. Instant notes in biochemistry. **Biochemical education**, v.25, p.253–254, 1997.

HAMZA, R.Z.; AL-HARBI, M.S.; AL-HAZAA, M.A. Neurological Alterations and Testicular Damages in Aging Induced by D-Galactose and Neuro and Testicular Protective Effects of Combinations of Chitosan Nanoparticles, Resveratrol and Quercetin in Male Mice. **Coatings** **2021**, 11, 435. <https://doi.org/10.3390/coatings11040435>

HASHEM, E. Z.; ESLAMI, M. Kinetin improves motility, viability and antioxidative parameters of ram semen during storage at refrigerator temperature. **Cell and Tissue Banking**, p.1-15, 2016.

HOLDEN, C. A.; HYNE, R. V.; SATHANANTHAN, A. H.; TROUNSON, A. O. Assessment of the human sperm acrosome reaction using concanavalin A lectin. **Molecular Reproduction and Development**, v.25, p. 247-57, 1990.

IBGE. (2021). Produção Agropecuária - Ovinos. Recuperado em 17 de maio de 2023, de <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/ovino/brasil.html>

INAMASSU, A.; VECHI, E.; LOPES, M. D. Viabilização do teste hipo-osmótico em cães e sua relação com outras variáveis espermáticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, p. 302-304, 1999.

JAGETIA, G.C.; SHETTY, P.C.; VIDYASAGAR, M. S. Inhibition of Radiation-Induced DNA Damage by Jamun, *Syzygium cumini*, in the Cultured Splenocytes of Mice Exposed to Different Doses of γ -Radiation. **Integrative Cancer Therapies**, v.11, p. 141 –153, 2012.

JONES, R.; MANN, T. Damage to spermatozoa by peroxidation endogenous phospholipids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 50, p. 261-68, 1977.

KOPPERS, A. J., GARG, M. L., AND AITKEN, R. J. Stimulation of mitochondrial reactive oxygen species production by un-esterified, unsaturated fatty acids in defective human spermatozoa. **Free Radic. Biol. Med.** n. 48, v. 1, p. 112–119, 2010.

KUÇUK, N.; AKSOY, M.; UCAN, U.; AHMAD, E.; NASEER, Z.; CEYLAN, A.; SERIN, I. Comparison of two different cryopreservation protocols for freezing goat semen. **Cryobiology**, v.68, p.327–331, 2014.

LA FALCI, V. S. N.; YRJÖ-KOSKINEN, A. E.; FAZELI, A.; HOLT, W. V.; WATSON, P. F.

- Antioxidant combinations are no more beneficial than individual components in combating ram sperm oxidative stress during storage at 5 C. **Animal reproduction science**, v.129, n.3, p.180-187, 2011.
- LEWIS, S. E.; MACCARRONE, M. Endocannabinoids, sperm biology and human fertility. **Pharmacological Research : The Official Journal of the Italian Pharmacological Society**. v.60, n.2, p.126–31, 2009.
- LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. **Reproductive Biology**, v. 5, n. 1, p. 5-17, 2005.
- MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; RAMOS, A. F. Criopreservação de recursos genéticos animais brasileiros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 64-68, 2011.
- MARTINS, Espedito Cezário et al. Cenários mundial e nacional da caprinocultura e da ovinocultura. **Boletim ativos de ovinos e caprinos**, v. 3, n. 2, p. 3-6, 2016.
- MATA-CAMPUZANO, M.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; ÁLVAREZ, M.; TAMAYO-CANUL, J.; ANEL, L.; DE PAZ, P.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Post-thawing quality and incubation resilience of cryopreserved ram spermatozoa are affected by antioxidant supplementation and choice of extender. **Theriogenology**, v.83, n.4, p. 520-528, 2015.
- MERT, H.; KARAKUS, K.; YILMAZ, A.; AYGUN, T.; MERT, N.; APAYDIN, B.; SEYHAN, E. Effects of genotype on testis, semen quality, and mineral composition of semen in various ram breeds. **Biological trace element research**, v.132, n.1-3, p. 93-102, 2009.
- MORTIMER, S. T. CASA - Practical Aspects, **Journal of andrology**, v. 21, n. 4, p. 515-524, 2000.
- MUIÑO-BLANCO, T.; PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. **Reproduction in domestic animals**, v.43, n. 4, p.18-31, 2008.
- MUSSI, L. P. Estudo do fruto *Syzygium cumini* (myrtaceae): efeito da maturação, características físico-químicas, secagem e estabilidade de produtos secos. 2018. 153 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos Dos Goytacazes, 2018.
- NASEER, Z., AHMAD, E.; AKSOY, M.; KÜÇÜK, N.; SERIN, I.; CEYLAN, A.; BOYACIOĞLU, M.; KUM, C. Protective effect of cholesterol-loaded cyclodextrin pretreatment against hydrogen peroxide induced oxidative damage in ram sperm. **Cryobiology**, v.71, n.1, p. 18-23, 2015.
- OBERST, E. R.; JOBIM, M. I. I.; MATTOS, R. C.; KROTH, E.; LARA, G.;

- SMIDERIE, W.; BRONZONATO, M. Teste hiposmótico e sua relação com outros métodos para a avaliação da integridade da membrana plasmática do carneiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, p. 375-376, 2003.
- PADILHA, R. T.; MAGALHÃES-PADILHA, D. M.; CAVALCANTE, M. M.; ALMEIDA, A. P.; HAAG, K. T.; GASTAL, M. O.; NUNES, J. F.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R.; OLIVEIRA, M. A. L. Effect of insulin-like growth factor-I on some quality traits and fertility of cryopreserved ovine semen. **Theriogenology**, v.78, n.4, p.907-913, 2012.
- PEÑA, F. J.; SARAVIA, F.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; MARTÍNEZ RODRÍGUEZ, H. Um método novo e simples para avaliar as alterações da membrana início em congelados e descongelados espermatozoides javali. **International Journal of Andrology**, v. 28, p.107-114, 2005.
- PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small ruminant research**, v. 63, n. 3, p. 215-225, 2006.
- RODRÍGUEZ-MARTINEZ, O. D. Y. C.; ARAKI, K.; GARCIA, I.; VASSALLI, P. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. **The EMBO Journal**, v.16, p.2262-2270, 2007.
- ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. [Antioxidant system involving the glutathione metabolic cycle associated to electroanalytical methods in the oxidative stress evaluation]. **Quimica Nova**, v. 24(1), p. 112-119, 2001.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. ; PEREZ-JIMENEZ, J.; SAURACALIXTO, F. D.; MANCINI FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of eighteen non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996-1002, 2010.
- SAFARINEJAD M.R, HOSSEINI S.Y, DADKHAH F, ALI ASGARI M. Relationship of omega-3 and omega-6 fatty acids with semen characteristics, and anti-oxidant status of seminal plasma: A comparison between fertile and infertile men. *Clin. Nutr.* 2010;29:100–105
- SALEH, R. A., & AGARWAL, A. (2002). Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *Journal of Andrology*, 23(6), 737-752. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2002.tb03229.x>
- SANTIANI, A. Uso de antioxidantes para mejorar la calidad de semen criopreservado. **Asociación Peruana de Reproducción Animal–Spermova**, v.3, n.2, p. 154-157, 2013.
- SCOTT, T. W.; DAWSON, R. M. C. Metabolismo f phospholipids by spermatozoa and seminal plasma. **Biochem. J.** v. 108, p. 457, 1968.
- SILVA, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1469, p.197–235,

2006

SILVA, R. A. B.; BATISTA, M. C. S.; NASCIMENTO, C. B.; ALVEZ, R. P. A.; ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R.; CARDOSO, J. F. S.; PAULA, N. R. O. Caracterização zootécnica da ovinocultura e da caprinocultura na microrregião homogênea de Teresina, Piauí, Brasil. Embrapa Caprinos e Ovinos-Nota Técnica/Nota Científica, 2011.

SILVA R. C. B. Caracterização genética de populações ovinas nativas do nordeste brasileiro. 2007. 92f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Universidade Federal Rural do Pernambuco, 2007.

SILVA, S. N.; ABREU, I. C.; SILVA, G. F. C.; RIBEIRO, R. M.; LOPES, A. S.; CARTÁGENES, M. S. S.; FREIRE, S. M. F.; BORGES, C. R.; BORGES, M. O. R. The toxicity evaluation of *Syzygium cumini* leaves in rodents. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 22, p. 102-108, 2012.

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

SOUSA, D. B.; BICUDO, S.D.; AZEVEDO, H. C.; MAIA, M. S. Ranqueamento/agrupamento do sêmen congelado de carneiros da raça Santa Inês analisados pelo sistema CASA e sondas fluorescentes pela análise estatística multivariada. *Veterinária e Zootecnia*, v.20, p.649-657, 2012.

SOUSA FILHO, M.A.C; EVANGELISTA, L.S.M; BARROS, F.N; SILVA, J.H.L; OLIVEIRA, A.M.S; CAVALCANTE, M.M.A; BRANCO, Y.N.T; BRANCO, M.A; SOUZA, J.A.T. Effect of Addition Palmitic Acid and Vitamin E to the Tris-Egg Yolk Diluter in Canine Semen Cryopreservation. *Acta Scientiae Veterinariae*, [S.L.], v. 49, p. 1-8, 1 jan. 2021. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. <http://dx.doi.org/10.22456/1679-9216.116285>.

TAKAHASHI, H.; RIKIMARU, K.; KIYOHARA, R.; YAMAGUCHI, S. Effect of arachidonic acid- Enriched oil diet supplementation on the taste of broiler meat. *Asian-Australas J Anim Sci*. v. 25, p. 845–851, 2012.

TAVARES, I. M. C.; LAGO-VANZELA, E. S.; REBELLO, L. P. G.; RAMOS, A. M.; GÓMEZ-ALONSO, S. Comprehensive study of the phenolic composition of the edible parts of jambolan fruit (*Syzygium cumini* (L) Skeels). *Food Research International*, v. 82, p. 1–13, 2016.

TAVILANI, H.; DOOSTI, M.; ABDI, K.; VAISIRAYGANI, A.; JOSHAGHANI, H.R. Decreased polyunsaturated and increased saturated fatty acid concentration in spermatozoa from asthenozoospermic males as compared with normozoospermic males. *Andrologia*, v.38, p.173 – 178, 2006.

TRALDI, A. S. Tópicos em reprodução e I.A. em caprinos. [S.l.]: **Manual técnico**, 1994.

- VASCONCELOS, A. B. Bioquímica do sêmen. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 18, 2009, Belo Horizonte, MG. Anais. 2009.
- VERSTEGEN J, IGUER-OUADA M, ONCLIN K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 57:149-179.
- VIANA, J. G. A. Panorama geral da ovinocultura no mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**, v. 4, n. 12, p. 44-47, 2008.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61. p. 481-492, 2000.
- ZHU Z., LI R., FENG C., LIU R., ZHENG Y., HOQUE S.A.M., WU D., LU H., ZHANG T. & ZENG W. 2020. Exogenous oleic acid and palmitic acid improve boar sperm motility via enhancing mitochondrial β -oxidation for ATP generation. **Animals**. 10(591): 1-15.