

AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO DE EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE PLANTAS COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO

EVALUATION OF THE EXTRACTS AND PLANTS ISOLATED SUBSTANCES ADDITION WITH ANTIOXIDANT POTENTIAL FOR CRYOPRESERVATION OF HUMAN SEMEN

Angelica Siewert^{1*}, Rafael Alonso Salvador², David Til³, Tamara Lamim⁴, Vera Lucia Lângaro Amaral⁵

¹ Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI, Itajaí, SC, Brasil. Pesquisadora do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução – Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI, Itajaí, SC, Brasil.

² Especialista em Reprodução Humana Assistida pelo Instituto Sapientiae – Faculdade de Medicina de Jundiaí, SP, Brasil. Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI, Itajaí, SC, Brasil. Pesquisador do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução – Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI, Itajaí, SC, Brasil.

³ Especialista em Reprodução Humana Assistida pelo Instituto Sapientiae – Faculdade de Medicina de Jundiaí, SP, Brasil. Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI, Itajaí, SC, Brasil. Pesquisador do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução – Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI, Itajaí, SC, Brasil. Docente na Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI, Itajaí, SC, Brasil.

⁴ Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI, Itajaí, SC, Brasil. Pesquisadora do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução – Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI, Itajaí, SC, Brasil.

⁵ Doutoranda em Oncologia pela Fundação Antônio Prudente, SP, Brasil. Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI, Itajaí, SC, Brasil. Especialista em Reprodução Humana Assistida pelo Instituto Sapientiae – Faculdade de Medicina de Jundiaí, SP, Brasil. Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI, Itajaí, SC, Brasil. Responsável pelo Laboratório de Biotecnologia da Reprodução – Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI, Itajaí, SC, Brasil. Docente na Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI, Itajaí, SC, Brasil.

*Endereço para correspondência:

Rua 3604, nº 165, Centro, Balneário Camboriú, SC, Brasil, Cep: 88330-236

Telefone: (47) 98409-4105

Email: angelica.siewert@gmail.com

RESUMO

O processo de criopreservação de sêmen gera espécies reativas ao oxigênio que causam danos aos espermatozoides. Esse efeito pode ser evitado com a adição de antioxidantes que estão presentes em diversas plantas. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito sobre a criopreservação de sêmen humano com os seguintes tratamentos: 1) flores de *Allamanda cathartica*, 2) folhas de *Solanum diploconus*, 3) casca do fruto de *Solanum diploconus*, 4) casca do fruto de *Bromelia balansae*, 5) folhas de *Piper cernuum*, 6) caule de *Piper cernuum*, 7) inflorescência de *Piper aduncum*, 8) folhas de *Piper aduncum*, 9) folhas de *Litchi chinensis*, 10) hidrolisado de *Lepidium meyenii*, 11) folhas de *Ardisia elliptica*, 12) folhas de *Vochysia bifalcata* e 13) preparações isoladas de ácido ursólico e 14) plumerídeo. Foram realizadas as análises de rotina das amostras (n=64) e realizado teste de toxicidade dos extratos. O sêmen foi criopreservado utilizando Test Yolk Buffer Media (Irvine Scientific®, TYB). O sêmen de cada paciente foi dividido em alíquotas de controle, sem qualquer tratamento e com três concentrações (1,25%, 0,5% e 0,25%) dos extratos das plantas. As amostras foram descongeladas e analisadas a vitalidade e motilidade. Avaliação da atividade mitocondrial (DAB) e termorresistência (TTR) também foram realizados. O extrato de folhas de *Litchi chinensis* apresentou o melhor resultado após o descongelamento, embora não tenha sido superior estatisticamente ao controle. Os testes do DAB e TTR não apresentaram diferença em relação ao controle. Portanto, é necessária a realização de outros testes para verificar o potencial de proteção deste extrato.

Palavras-Chave: criopreservação; espermatozoides; antioxidantes.

ABSTRACT

Cryopreservation of human semen generates reactive oxygen species that cause damage to sperm. This effect can be prevented by the addition of antioxidants, that are present in various plants. The objective of this study was to evaluate the effect on human semen cryopreservation of the following treatment: 1) Flowers of *Allamanda cathartica*, 2) Leaves of *Solanum diploconus*, 3) Bark from *Solanum diploconus*, 4) fruit of *Bromelia balansae*, 5) Leaves of *Piper cernuum*, 6) Stem of *Piper cernuum*, 7) Inflorescence of *Piper aduncum*, 8) Leaves of *Piper aduncum*, 9) leaves from *Litchi chinensis*, 10) hydrolysates of *Lepidium meyenii*, 11) leaves from *Ardisia elliptical*, 12) leaves from *Vochysia bifalcata*, 13) preparations of ursolic acid and 14) plumerid coumarate solutions. Routine semen analysis was performed (n=64) before toxicity test. Semen samples were cryopreserved using Test Yolk Buffer Media (Irvine Scientific®, TYB), to which plant extracts were added at three concentration (1.25%, 0.5% and 0.25). Samples were thawed and the vitality and motility analyzed. Mitochondrial activity (DAB) and heat resistance (TTR) were also performed. The leaf extract of *Litchi chinensis* showed the best result after thawing, although it was not statistically higher than the control. The DAB and TTR tests showed no difference compared to the control. In conclusion, it is necessary to conduct further tests to verify the protection potential of these extract.

Key Words: cryopreservation; sperm; antioxidants.

INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen é geralmente utilizada por homens que irão se submeter às condições que possam comprometer sua fertilidade, como cirurgias e tratamentos oncológicos, que utilizam radioterapia e quimioterapia. Homens que realizam a vasectomia, mas que não descartam a possibilidade de terem filhos no futuro, também podem armazenar seus espermatozoides. Além dos bancos de sêmen chamados terapêuticos, existem os de sêmen de doadores anônimos, estes utilizados por casais cujo o homem é infértil, ou ainda por mulheres sem parceiro mas que desejam engravidar.

Os espermatozoides criopreservados são mantidos viáveis armazenados em nitrogênio líquido, porém com o metabolismo suspenso, para isso é necessária a utilização de crioprotetores para evitar danos à membrana, organelas e citoesqueleto das células, provocados por cristais de gelo que se formam durante a criopreservação. Os crioprotetores utilizados normalmente são glicerol (1), lipoproteínas da gema do ovo (2), dimetilsulfóxido(3) e/ou açúcares (4).

Os crioprotetores devem possuir baixa toxicidade e podem ser intracelulares (penetrantes) ou extracelulares (não penetrantes). Os primeiros diminuem os efeitos químicos e mecânicos da criopreservação dentro da célula, já os não penetrantes aumentam a osmolaridade do meio extracelular fazendo com que a água do meio intracelular passe para o meio extracelular, impedindo a formação de cristais de gelo no seu interior (5).

O maior problema é que mesmo utilizando as melhores técnicas e crioprotetores, muitos espermatozoides morrem no processo de criopreservação (6), pois são formadas espécies reativas ao oxigênio (EROS) e o processo oxidativo tem efeito destrutivo na membrana plasmática e no DNA dos espermatozoides (7) como também à membrana mitocondrial e conseqüentemente a diminuição da motilidade. Dentre as EROS se destacam o superóxido e peróxido de hidrogênio, que atuam de diferentes maneiras na membrana plasmática, aumentam a fragmentação do DNA, despolimerizam ácidos hialurônicos, modificam o citoesqueleto e inibem a fusão dos espermatozoides com o oócito (8,9). O

estresse oxidativo diminui a fosforilação das proteínas do axonema e pode provocar a imobilização espermática (10), além de provocar a perda da função da célula e da integridade do material genético (11).

No plasma seminal e nos espermatozoides, existem substâncias enzimáticas que tem ação antioxidantes para diminuir os efeitos das EROS, como super-óxido dismutase, catalase e o sistema peroxidase/redutase e as não enzimáticas como as vitaminas E e C (12), porém não são suficientes para o processo de resfriamento, onde há um aumento na produção de EROS por causa das mudanças metabólicas (9,13).

A adição de antioxidantes, ao meio de criopreservação, pode aumentar a sobrevivência celular, como foi demonstrado pelo estudo de Castilho e colaboradores (7), que verificaram a eficiência do ácido ascórbico na manutenção da integridade da membrana plasmática dos espermatozoides caprinos, durante o processo de criopreservação. Outro estudo de Castilho (6) verificou o mesmo efeito crioprotetor, em sêmen de touro, contudo com a adição do suco da melancia que possui ação antioxidante pela presença do carotenoide licopeno.

Outros autores já testaram substâncias com ação antioxidantes em espermatozoides de diferentes espécies de mamíferos, como Garcez (14) que adicionou o resveratrol, Borges (15) a vitamina C e vitamina E e Borges (16) Trolox (antioxidante-Dil T) ao crioprotetor comercial e tiveram resultados positivos em relação ao controle após o descongelamento.

As substâncias antioxidantes são utilizadas para defesa dos organismos contra os radicais livres que se formam pelo metabolismo celular e são encontradas principalmente em plantas (17). Algumas delas possuem grande quantidade de antioxidantes, como os gêneros *Piper*, *Allamandae*, *Litchi*, das famílias Piperaceae, Apocynaceae e Sapindaceae, respectivamente.

Neste estudo, foi analisado o efeito sobre os espermatozoides humanos submetidos a criopreservação com a adição dos extratos de flores de *Allamanda cathartica*, folhas e casca do fruto de *Solanum diploconus*, casca do fruto de *Bromelia balansae*, folhas e caule de *Piper*

cernuum, inflorescência e folhas de *Piper aduncum*, folhas de *Litchi chinensis*, hidrolisado de *Lepidium meyenii*, folhas de *Ardisia elíptica* e folhas de *Vochysia bifalcata*. Também foram analisadas as substâncias isoladas analisadas foram ácidoursólico e plumerídeo, estas foram isoladas de extratos das partes aéreas da *Allamanda cathartica*.

O gênero *Piper* possui metabólitos como alcaloides, taninos condensados, flavonoides e triterpenos, como por exemplo, a vitexina e o lupeol, entre outros que contribuem para a sua atividade antioxidante (18).

Diversos flavonoides já foram isolados do gênero *Allamanda* que atribuem um papel de proteção para a planta contra fungos e bactérias (19), entre eles a rutina que forma complexos com os radicais livres (20).

Diferentes frações de polissacarídeos extraídos e purificados de frutos de *Litchi chinensis* possuem atividades antioxidantes (21), além disso, possuem procianidinas oligoméricas que tem capacidade de sequestrar hidroxilas (22).

O extrato aquoso da semente de lichia pode aumentar a sensibilidade à insulina, reajustar a lipodistrofia e o metabolismo irregular de glicose, reforçar a ação antioxidante e melhorar as funções do fígado e rim em estudos com ratos portadores de diabetes tipo 2 (23). Além disso, o extrato de *Litchi chinensis* é muito utilizado em preparações cosméticas tópicas, para o controle do envelhecimento, devido ao seu poder antioxidante (24).

O ácido ursólico é uma substância isolada da *Allamanda cathartica*, que possui atividade antitumoral, anti-inflamatória, hepatoprotetora, antialérgica, gastroprotetora e também possui ação antioxidante (25).

O plumerídeo (PDO) é um iridóide isolado das partes aéreas de *Allamanda sp.* (26). Iridóides são uma classe de terpenos, que possui atividade antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante (27).

São as propriedades antioxidantes das plantas selecionadas que tornam seus extratos e substâncias isoladas com potencial de proteção e que poderiam evitar efeitos negativos da criopreservação, sendo assim, selecionadas para este estudo.

METODOLOGIA

Foram utilizadas 64 amostras provenientes de pacientes que realizaram espermograma e assinaram o TCLE (Termo de Consentimento Livre Esclarecido). Este estudo foi aprovado pelo parecer nº 1.046.918 da CEP/Univali.

Para classificar a qualidade da amostra, aproximadamente 60 minutos após a coleta, foram realizadas as análises prévias dos seguintes parâmetros seminais: concentração, vitalidade e motilidade dos espermatozoides e somente amostras com parâmetros normais de acordo com a OMS (2010) foram utilizadas.

A concentração das amostras foi determinada por contagem em Câmara de Neubauer. A análise da motilidade foi realizada em lâmina/lamínula, em microscópio óptico (400X) e analisados 100 espermatozoides, sendo classificados como: progressivo (A), não progressivo (B) e imóvel (C).

Para a análise da vitalidade foi utilizada eosina 0,5% e amostra fresca (1:1) em lâmina/lamínula, em microscópio óptico (400X) e analisados 100 espermatozoides. Esta técnica se baseia no fato que o corante penetra nas células mortas por estas apresentarem lesão na membrana.

Teste de toxicidade

Análises de toxicidade foram realizadas previamente para cada extrato testado, estes foram diluídos em HTF modificado (Human Tubal Fluid - Irvine Scientific®) suplementado com 10% de SSS (Serum Substitute Supplement - Irvine Scientific®) nas seguintes concentrações: 1,25%, 0,5% e 0,25%. Foi realizada a análise dos parâmetros espermáticos (motilidade e vitalidade), imediatamente à adição dos extratos e novamente após 1 hora de exposição mantidas a 37°C em estufa. Foram selecionados para a criopreservação os extratos que não indicaram sinais de toxicidade, ou seja, os que não apresentaram diminuição da motilidade e vitalidade comparado ao controle.

Criopreservação

O meio crioprotetor TYB (Test Yolk Buffer Media - Irvine Scientific®) foi adicionado às amostras frescas na proporção 1:1, sendo divididas em alíquotas: uma

apenas com o meio crioprotetor e outras contendo o crioprotetor mais as concentrações dos extratos selecionados. Foram envasadas em palhetas criogênicas de 500µl, transferidas para refrigerador (2 a 8°C) por 20 minutos e posteriormente mantidas em vapor de nitrogênio líquido (-80°C) durante 10 minutos (28). Somente após este procedimento foram imersas no nitrogênio líquido. As amostras foram criopreservadas em duplicata.

Após 24 horas, as amostras foram removidas do nitrogênio, descongeladas em estufa microbiológica (37°C) por 20 minutos. O crioprotetor foi removido, adicionando-se às amostras meio HTF modificado (Human Tubal Fluid - Irvine Scientific®) suplementado com 10% de SSS (Serum Substitute Supplement - Irvine Scientific®) na proporção de 2:1 (meio: amostra), e submetidas a centrifugação (800G) por 5 minutos. Após a centrifugação, foi retirado o sobrenadante e o pellet foi ressuscitado com 300µl do mesmo meio. Análises de vitalidade e motilidade foram realizadas para avaliação da eficiência de cada diluição do extrato.

Análise da atividade mitocondrial

A atividade mitocondrial desempenha um importante papel na respiração celular e no metabolismo energético, atuando na função osmótica, na motilidade e na manutenção da estrutura celular e ela pode ser avaliada pelo método de DAB (29).

Os extratos que apresentaram melhores resultados foram submetidos ao teste de atividade mitocondrial, determinado pelo método descrito por Hrudka (29). Foram colocados 10µl das amostras de sêmen descongeladas em um microtubo envolto em papel laminado e tampado, juntamente com 10µl (proporção 1:1) da solução de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) diluída em PBS na concentração de 1mg de DAB para 1mL de PBS.

A solução de DAB com o sêmen foi mantida em banho-maria a 37°C na ausência de luz por 5 horas. Depois disso, foram realizados esfregaços das amostras e avaliados por microscopia (1000X). Foram analisados 100 espermatozoides, segundo classificação de Hrudka (29):

Classe I: quase todas as mitocôndrias ativas, caracterizado por uma coloração marrom ao longo de toda a bainha mitocondrial (peça intermediária).

Classe II: bainha mitocondrial fragmentada, com regiões ativas (coradas) e regiões inativas (não corada), com predominância das regiões coradas (superior a 50%).

Classe III: bainha mitocondrial fragmentada, com regiões ativas (coradas) e regiões inativas (não corada), com predominância das regiões não coradas (superior a 50%).

Classe IV: bainha mitocondrial completamente inativa, totalmente não corada.

Teste de termorresistência (TTR)

Os extratos que apresentaram melhores resultados também foram submetidos ao teste de termorresistência (TTR) após o descongelamento. Este procedimento é utilizado para a avaliação do potencial de fertilidade (30), as amostras permaneceram em incubadora (37°C) e foram analisados os parâmetros seminais de vitalidade e motilidade após 24 horas.

Análise estatística

Para a comparação das médias, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), adotando-se o nível de significância de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Os extratos da folha e da casca de *Solanum lycopersicum* (Tomate), assim como o extrato da casca de *Bromelia balansae* (Caraguatá), apresentaram 100% de mortalidade dos espermatozoides após o teste de toxicidade nas diferentes concentrações testadas. Esses extratos foram descartados do estudo, não sendo viáveis para a criopreservação.

Os extratos de *Allamanda sp.*, flores de *Piper cernuum*, caule de *Piper cernuum*, inflorescência de *Piper amplum*, folhas de *Piper amplum*, *Lepidium meyenii* (Maca peruana), folhas de *Ardisia crenata* e folhas de *Vochysia bifalcata*, assim como as substâncias isoladas ácido ursólico e plumerídeo apresentaram taxas de sobrevivência e motilidade espermática inferiores ao do controle após o descongelamento, mesmo em concentrações variadas, não conferindo o efeito crioprotetor esperado.

O extrato de *Litchi chinensis* (Lichia) apresentou o melhor resultado em relação aos demais extratos, quanto aos parâmetros seminais, após o descongelamento, foram observadas taxas semelhantes ao do controle quanto a motilidade e vitalidade, embora não significativas estatisticamente (Tabela 1). Para estes dados foram utilizadas 10 amostras seminais.

Tabela 1. Valor médio (\pm erro padrão da média) da taxa de recuperação dos parâmetros seminais (vitalidade e motilidade) em percentual após o descongelamento e 24 horas (TTR) com diferentes concentrações do extrato de *Litchi chinensis*.

	Controle	1,25%	0,50%	0,25%
Motilidade Total (A+B)	49,49 ($\pm 3,79$)	41,96 ($\pm 6,23$)	44,53 ($\pm 5,61$)	38,52 ($\pm 5,78$)
Motilidade Progressiva (A)	39,30 ($\pm 4,76$)	27,73 ($\pm 6,68$)	35,84 ($\pm 5,44$)	32,26 ($\pm 5,57$)
Vitalidade	54,30 ($\pm 4,81$)	49,36 ($\pm 6,98$)	50,01 ($\pm 5,98$)	52,27 ($\pm 4,99$)
Motilidade Total (TTR)*	8,83 ($\pm 3,75$)	4,50 ($\pm 2,91$)	10,00 ($\pm 5,09$)	4,16 ($\pm 3,40$)
Vitalidade (TTR)*	24,50 ($\pm 4,33$)	24,16 ($\pm 8,36$)	22,83 ($\pm 7,43$)	17,16 ($\pm 5,38$)

*TTR: Teste de Termorresistência após 24 horas de incubação da amostra descongelada.

A taxa de recuperação da motilidade total, motilidade progressiva e vitalidade das amostras do controle comparadas as das concentrações do extrato da Lichia, não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$) pela análise de variância (ANOVA) após aquecimento.

Também não foram observadas diferenças significativas nas taxas de recuperação da motilidade total ($p = 0,62$) e vitalidade ($p = 0,87$) das amostras com extrato de Lichia em relação ao controle após o TTR.

Na avaliação da atividade mitocondrial também não foram observadas diferenças estatísticas (Tabela 2).

Tabela 2. Valor médio (\pm erro padrão da média) em percentual das Classes I, II, III e IV da reação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB), para a avaliação da atividade mitocondrial dos espermatozoides submetidos à criopreservação com diferentes concentrações do extrato de *Litchi chinensis*.

	Controle	1,25%	0,50%	0,25%	p
Classe I	7,00 ($\pm 1,71$)	8,00 ($\pm 2,69$)	6,16 ($\pm 2,04$)	3,50 ($\pm 1,31$)	0,44
Classe II	58,83 ($\pm 6,06$)	49,66 ($\pm 10,26$)	48,33 ($\pm 7,25$)	37,16 ($\pm 7,70$)	0,39
Classe III	26,83 ($\pm 4,71$)	24,50 ($\pm 4,88$)	32,83 ($\pm 7,18$)	44,66 ($\pm 6,81$)	0,11
Classe IV	9,33 ($\pm 2,03$)	17,83 ($\pm 8,83$)	12,33 ($\pm 2,65$)	14,16 ($\pm 3,39$)	0,68

Foram testadas outras concentrações (variando de 0,13% a 10%) e em tempos diferentes de exposição ao extrato antes da criopreservação (5, 10, 20 e 30 minutos), contudo não apresentaram diferença significativa entre os tempos, sendo que a partir da concentração de 1,5% o extrato apresentou toxicidade, tendo resultados de motilidade e vitalidade menores que o controle (dados não demonstrados).

DISCUSSÃO

O processo de criopreservação pode afetar a estrutura e o metabolismo celular devido à produção excessiva de espécies reativas ao oxigênio, comprometendo a sobrevivência celular pós-descongelamento (31). Estudos e novos protocolos de criopreservação com o objetivo de conferir maior proteção aos espermatozoides são importantes para o sucesso das tecnologias de reprodução assistida (32).

Os antioxidantes são a principal defesa contra o estresse oxidativo induzido por radicais livres produzidos durante a criopreservação de espermatozoides. Apesar de a literatura científica apresentar resultados favoráveis com uso de antioxidantes no sêmen humano, o volume de informações ainda é bastante limitado. Por isso, são relevantes os estudos que avaliem a adição de substâncias antioxidantes potencialmente capazes de elevar os parâmetros espermáticos e a qualidade seminal após a criopreservação.

A suplementação dos meios de criopreservação com antioxidantes podem adicionar algum grau de proteção aos espermatozoides contra os criodanos induzidos por estresse oxidativo (14). Inúmeras plantas contêm diversos compostos antioxidantes, tais como ácido ascórbico, tocoferol, glutathiona, carotenóides, flavonóides entre outros, os quais podem contribuir para a proteção contra o dano oxidativo (24).

Os extratos brutos possuem todas as substâncias derivadas do vegetal, podendo algumas se mostrarem benéficas e outras tóxicas para as células. Já as substâncias isoladas, são extraídas e separadas das demais, isso garante apenas a ação do princípio ativo de interesse, entretanto, alguns extratos podem possuir melhores resultados pela ação que seus compostos

possuem em conjunto, sendo responsável tanto pelo efeito terapêutico quanto pela menor frequência de toxicidade (33).

Os extratos podem ser preparados de diversas maneiras e com diferentes solventes, sendo a qualidade dos extratos de plantas muito influenciada pelo método de extração (34), podendo haver perda do potencial antioxidante durante a extração e em seu armazenamento, talvez este fator possa ter contribuído para os resultados deste estudo, de alguns extratos e substâncias isoladas na proteção às células espermáticas.

Nos testes preliminares deste estudo, quanto a toxicidade, se observou que o extrato de *Litchi chinensis* (Lichia) não apresentou efeito tóxico e os resultados apresentaram-se semelhantes ao do controle, quanto aos parâmetros de motilidade e vitalidade espermática após o descongelamento, assim como após o teste de termorresistência, embora sem diferença estatística.

O fruto da Lichia possui forte atividade antioxidante, as antocianinas que contém um excelente poder redutor, podem ser benéficas na eliminação de radicais livres e na redução da peroxidação lipídica (35). Testes específicos que demonstrassem efeito sobre a peroxidação lipídica da membrana espermática, não foram realizados pois não era um dos objetivos deste estudo, mas sim a seleção preliminar de extratos com potencial proteção quanto aos parâmetros primários avaliados.

A motilidade é um dos parâmetros fundamentais para a habilidade de fertilização do espermatozoide (36). É citada na literatura a existência de uma redução significativa na porcentagem de espermatozoides móveis após o descongelamento em comparação ao sêmen fresco (36,37). Este dado foi observado neste trabalho, pois ocorreu uma diminuição da motilidade após o descongelamento, tanto nas amostras do controle quanto nas amostras com adição de concentrações dos extratos de Lichia.

Esperava-se que o uso dos extratos das plantas, com potencial antioxidante, apresentasse algum resultado favorável quanto à crioproteção dos espermatozoides neste estudo, assim como o observado no trabalho de Castilho (6), que utilizou o extrato líquido da melancia (25%) adicionado ao

meio de criopreservação de sêmen de touro, e observou a manutenção da integridade da membrana plasmática e viabilidade após o teste de termorresistência.

Em outro estudo de Castilho e colaboradores (7), foi observada a manutenção da integridade da membrana das células espermáticas e sua viabilidade após o teste de termorresistência nas concentrações de 0,25% e 0,05% de ácido ascórbico na criopreservação de sêmen caprino.

Garcez (14), utilizou o resveratrol, composto isolado da uva (*Vitis sp.*) e com ação antioxidante, que apresentou efeitos benéficos na criopreservação de sêmen humano nas concentrações de 0,1, 1,0 e 10,0 mM, sendo capaz de prevenir os danos lipídicos induzidos pela criopreservação.

O teste para a avaliação da atividade mitocondrial neste estudo, também não demonstrou diferenças significativas nas classes de coloração entre os grupos, apresentando taxas de respiração celular parecidas com o controle. Ou seja, mesmo ocorrendo queda nos parâmetros de vitalidade e motilidade, os espermatozoides apresentavam respiração celular após o descongelamento, inclusive em algumas células com a membrana danificada, que eram consideradas mortas no teste de vitalidade. Sabe-se que a produção elevada de espécies reativas ao oxigênio induz danos à membrana mitocondrial, levando a modificações patofisiológicas nos espermatozoides (38).

O teste de termorresistência (TTR) consiste na avaliação da longevidade dos espermatozoides após o descongelamento, sendo uma simulação parcial *in vitro* do processo *in vivo* que o sêmen teria no interior do trato reprodutor (39), sendo o procedimento utilizado para a avaliação do potencial de fertilidade. Neste estudo, não houve diferenças significativas neste teste, entre as concentrações dos extratos utilizadas em relação ao controle.

A maioria dos extratos testados apresentou toxicidade, estas espécies apresentam alcaloides que podem ser responsáveis por este resultado. O pH dos extratos também pode ter influenciado nos resultados negativos após o teste de toxicidade e descongelamento, já que estes extratos possuem pH ácido.

Foi observado toxicidade em outros estudos, como apresentado por Santos (40), que fez uso da própolis na criopreservação de sêmen equino, e foram analisadas a motilidade, funcionalidade mitocondrial, integridade da membrana plasmática, DNA e acrossoma, sendo os resultados inferiores ao controle. Este resultado negativo foi observado, também, na criopreservação de sêmen caprino com o uso da própolis, quando realizados os testes de motilidade, vigor espermático, vitalidade, hiposmótico e teste de termorresistência(7).

É importante destacar que cada substância antioxidante possui efeito biológico dependente de sua estrutura, concentração e via metabólica, fatores que podem determinar valores variáveis após o seu uso, justificando a não proteção das células diante dos danos oxidativos sofridos pela criopreservação.

Apesar da motilidade e da vitalidade serem os parâmetros mais utilizados para avaliar a viabilidade espermática após o descongelamento, muitos trabalhos utilizam também a avaliação da integridade da membrana plasmática através do teste hiposmótico (41) e da fragmentação do DNA (42).

A membrana espermática possui funções ativas no processo de fertilização como a capacitação, reação acrossômica e interação com a membrana plasmática do oócito (43), por isso a avaliação de sua integridade é um teste complementar que poderia mensurar se a capacidade fecundante do espermatozoide foi alterada pelas espécies reativas ao oxigênio. Talvez este teste, se tivesse sido realizado, comprovaria a eficiência do extrato de *Litchi chinensis* como crioprotetor.

O sêmen com um perfil antioxidante reduzido é intimamente associado à baixa qualidade espermática e com alto grau de fragmentação de DNA (44), por isso o estabelecimento do índice de fragmentação do DNA espermático é uma alternativa para a avaliação do benefício da adição dos extratos no meio de criopreservação.

Embora o extrato de *Litchi chinensis* não tenha apresentado efeito protetor no presente estudo, novos testes complementares necessitam ser realizados para verificar sua atividade.

Espécies diferentes de mamíferos apresentam membranas distintas e assim, as

células espermáticas são mais ou menos sensíveis ao processo de criopreservação, desta forma, os efeitos dos antioxidantes dos extratos utilizados neste estudo, podem não ter sido capazes de sobrepujar a ação deletéria da criopreservação sobre a estrutura da membrana celular em sêmen humano.

Os antioxidantes, de acordo com suas propriedades físico-químicas, interagem com espécies reativas ao oxigênio por diferentes caminhos, talvez o tempo de interação da Lichia com o sêmen não tenha sido adequado para promover a proteção necessária.

Outros estudos com a Lichia devem ser executados com a combinação de outros métodos de avaliação dos efeitos sobre a membrana espermática, danos oxidativos, além da fragmentação de DNA, para então se elevar a análise de informações sobre o seu uso na criopreservação seminal.

Novos extratos deverão ser testados com o objetivo de aprimorar a criopreservação seminal, este trabalho precursor poderá inspirar novos caminhos de investigação de antioxidantes, estes como uma ferramenta de aperfeiçoamento da preservação da fertilidade masculina.

CONCLUSÃO

Os extratos da folha e da casca de *Solanum lycopersicum*(Tomate), casca de *Bromelia balansae* (Caraguatá), *Allamanda sp.*, flores de *Piper cernuum*, caule de *Piper cernuum*, inflorescência de *Piper amplum*, folhas de *Piper amplum*, *Lepidium meyenii* (Maca peruana), folhas de *Ardisia crenata* e folhas de *Vochysia bifalcata*, assim como as substâncias isoladas ácido ursólico e plumerídeo foram tóxicos para os espermatozoides, não possuindo potencial crioprotetor.

O extrato de *Litchi chinensis* (Lichia) apresentou um melhor resultado quanto aos parâmetros seminais, após o descongelamento em relação aos demais extratos, embora não tenha sido superior estatisticamente ao controle.

A utilização de outros testes complementares de fragmentação de DNA, integridade da membrana e peroxidação lipídica, poderiam constatar o efeito

crioprotetor da Lichia e sua ação contra os danos das espécies reativas ao oxigênio.

Portanto, é notória a necessidade da realização de estudos que verifiquem a ação de antioxidantes sobre a integridade dos

espermatozoides após a criopreservação, para que o uso destas substâncias possa ser aprimorado e utilizado nas técnicas reprodutivas com resultados satisfatórios.

REFERÊNCIAS

- (1) SOUZA, W. L.; MORAIS, E. A. Dimetilformamida adicionada no sêmen de caprinos e seu efeito sobre a longevidade e funcionalidade da membrana espermática após criopreservação. **Revista Semiárido De Visu**, v. 5, n. 1, p. 11-20, 2017.
- (2) MADEIRA, E. M. et al. Evaluation of different intra and extracellular cryoprotectants on Bull sêmen cryopreservation. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 2, p. 415–420, abr. 2013.
- (3) 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.
- (4) COSTA, B. B. **Efeito da adição dos antioxidantes cisteína e glutamina ao diluidor de congelamento de sêmen de Jundiá (*Rhamdia quelen*)**. 2018. Dissertação [Mestrado em Zootecnia]. Faculdade Federal do Rio Grande do Sul. 2018.
- (5) GONZALEZ, R. A. F. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozoide bovino**. 2004. Tese [Doutorado em Reprodução Animal]. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, 2004.
- (6) CASTILHO, E. F. D. **Uso do extrato líquido de melancia (*Citrullus lanatus*) na criopreservação de sêmen de touros da raça nelore**. 2012. Tese [Doutorado em Medicina Veterinária]. Universidade Federal de Viçosa. 2012.
- (7) CASTILHO, E. F. DE et al. Use of propolis and ascorbic acid on goat sêmen cryopreservation. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 12, p. 2335–2345, 2009.
- (8) SOUZA, W. L. et al. Efeito de diferentes concentrações de melatonina em espermatozoides de carneiros sobre estresse oxidativo após criopreservação. **Pesq. Vet. Bras**, v. 36, n.7, p. 657–654, 2016.
- (9) OCHSENDORF, F. R. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. **Human Reproduction Update**, v. 5, n. 5, p. 399–420, 1 set. 1999.
- (10) AGARWAL, A.; SALEH, R. A.; BEDAIWY, M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and sterility**, v. 79, n. 4, p. 829–843, 2003.
- (11) BAKER, M. A.; AITKEN, R. J. The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 216, n. 1–2, p. 47–54, 15 mar. 2004.
- (12) CARVALHO, O. F. et al. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 1, p.33-38, 2002.
- (13) BANSAL, A. K.; BILASPURI, G. S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on sêmen functions. **Veterinary medicine international**, v. 2011, p.1-7, 2010.
- (14) GARCEZ, M. E. S. **Efeito do resveratrol e do ácido ascórbico na criopreservação de sêmen humano**. 2014. Tese [Doutorado em Biotecnologia]. Universidade de Caxias do Sul. 2014.
- (15) BORGES, J. C. **Utilização de antioxidantes associados ou não a emulsificante na criopreservação do sêmen bovino**. 2003. Tese [Doutorado em Medicina Veterinária]. Universidade Federal de Viçosa. 2003.
- (16) BORGES, J. C. **Efeito da utilização de antioxidante no diluidor para a**

criopreservação de sêmen bovino avaliado através de testes complementares, inseminação artificial e fecundação in vitro. 2008. Tese [Doutorado em Medicina Veterinária]. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP. 2008.

(17) BEZERRA, M. C. C; MORAIS, J; FERREIRA, M. C. M. Atividade antioxidante de chá de geléia de *Hibiscus sabdariffa* L. malvaceae do comercio varejista de Campo Mourão- PR. **Revista Iniciare**, v.2, n.1, 2017.

(18) ROVANI, G. et al. Investigação fitoquímica e antioxidante de partes vegetativas aéreas de *Piper amalago* L. **Cadernos das Escolas de Saúde**, v. 2, n. 10, p.164-177, 2013.

(19) SCHMIDT, D. DE F. N. **Estudo químico, biológico e farmacológico das espécies *Allamanda blanchetti* e *Allamanda schottii* para obtenção de frações e moléculas bioativas de potencial terapêutico.** 2005. Tese [Doutorado em Química]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina. 2005.

(20) BONOMINI, T. J. **Padronização da metodologia para extração do fitoconstituente majoritário das flores de *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae).** 2013. Dissertação [Mestrado em Ciências Farmacêuticas]. Universidade do Vale do Itajaí. 2013.

(21) YANG, B. et al. Identification of polysaccharides from pericarp tissues of Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit in relation to their antioxidant activities. **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 5, p. 634–638, 10 abr. 2006.

(22) LIU, L. et al. A-type procyanidins from Litchi chinensis pericarp with antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 105, n. 4, p. 1446–1451, 2007.

(23) GUO, J. et al. Pharmacological mechanism of Semen Litchi on antagonizing insulin resistance in rats with type 2 diabetes. **Zhongyao cai Journal of Chinese**

medicinal materials, v. 27, n. 6, p. 435–438, 2004.

(24) MOTTA, E. L. DA. **Avaliação da composição nutricional e atividade antioxidante de Litchi chinensis Sonn. (“Lichia”) Cultivada no Brasil.** 2009. Dissertação [Mestrado em Ciências Farmacêuticas]. Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2009.

(25) LEMES, G. DE F.; FERRI, P. H.; LOPES, M. N. Chemical constituents of *Hyptidendroncanum* (PohlexBenth.) R. Harley (Lamiaceae). **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 39–42, jan. 2011.

(26) PINTO, A. C. et al. Current status, challenges and trends on natural products in Brazil. **Química Nova**, v. 25, p. 45–61, maio 2002.

(27) LÓPEZ-CARRERAS, N.; MIGUEL, M.; ALEIXANDRE, A. Propiedades benéficas de los terpenos iridoides sobre la salud. **Sociedad Española de Dietética y Ciencias de La Alimentación**, 2012.

(28) REDE LATINO-AMERICANA DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA. **Manual de Procedimentos Laboratório de Reprodução Assistida.** Santiago do Chile, 2006.

(29) HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. **International journal of andrology**, v. 10, n. 6, p. 809–828, 1987.

(30) SILVA, B. G. DA; MORAES, E. A. Efeito da inclusão de colesterol após criopreservação do sêmen caprino sobre a fertilidade pelo teste de termorresistência. **Anais de congresso (ALICE).** Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/948754>>. Acesso em: 27 nov. 2014.

(31) LUZ, M. et al. Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células

germinativas e embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, p. 1-13, 2011.

(32) SLOWINSKA, M.; KAROL, H.; CIERESZKO, A. Comet assay of fresh and cryopreserved Bull spermatozoa. **Cryobiology**, v. 56, n. 1, p. 100–102, 2008.

(33) BETTEGA, P. V. C. et al. Fitoterapia: dos canteiros ao balcão da farmácia. **Arch. Oral Res**, v. 7, n. 1, p. 89–97, 2011.

(34) JUSTO, O. R. et al. Evaluation of the antioxidant potential of plant extracts obtained by super critical fluid extraction. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1699–1705, jan. 2008.

(35) DUAN, X. et al. Antioxidant properties of anthocyanins extracted from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit pericarp tissues in relation to their role in the pericarp browning. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1365–1371, 2007.

(36) THURSTON, L. M.; WATSON, P. F.; HOLT, W. V. Semen cryopreservation: a genetic explanation for species and individual variation? **Cryo Letters**, v. 23, n. 4, p. 255–262, ago. 2002.

(37) HALLAK, J. et al. Poor sêmen quality from patients with malignancies does not rule out sperm banking. **Urological research**, v. 28, n. 4, p. 281–284, 2000.

(38) MAKKER, K. et al. Oxidative stress & male infertility. **Indian J Med Res**, v. 129, n. 4, p. 357–367, 2009.

(39) BARROS, M. et al. 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.

(40) SANTOS, F. C. C. **Utilização de extrato de própolis verde no resfriamento de sêmen equino**. 2014. Dissertação [Mestrado em Veterinária]. Universidade Federal de Pelotas. 2014.

(41) BITTENCOURT, R. F. et al. Utilização do teste hiposmótico para avaliar a eficácia de diferentes protocolos de criopreservação do sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 213–218, 2006.

(42) EVENSON, D.; JOST, L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. **Methods in Cell Science**, v. 22, n. 2-3, p. 169–189, 2000.

(43) GADELLA, B. M. et al. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Animal reproduction science**, v. 68, n. 3, p. 249–265, 2001.

(44) SHAMSI, M. B. et al. DNA integrity and semen quality in men with low seminal antioxidant levels. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 665, n. 1, p. 29–36, 2009.

Enviado: 17/08/2016

Revisado: 12/07/2018

Aceito: 03/08/2018