

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Uso da lectina do Quiabo (*Abelmoschus esculentus*) como marcador da célula
espermática ovina**

Alessandra Cardoso da Silva

Pelotas, 2016

Alessandra Cardoso da Silva

**Uso da lectina do Quiabo (*Abelmoschus esculentus*) como marcador da célula
espermática ovina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carine Dahl Corcini
Coorientador: Prof. Dr. Luciano da Silva Pinto

Pelotas, 2016

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

S586u Silva, Alessandra Cardoso da

Uso da lectina do quiabo (*Abelmoschus esculentus*) como marcador da célula espermática ovina / Alessandra Cardoso da Silva. – 28f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Veterinária, 2016. – Orientadora Carine Dahl Corcini ; co-orientador Luciano da Silva Pinto.

1.Veterinária. 2.Lectina. 3.Ovinos. 4.*Abelmoschus esculentus*. 5.FITC. I.Corcini, Carine Dahl. II.Pinto, Luciano da Silva. III.Título.

CDD: 636.30821

Alessandra Cardoso da Silva

Uso da lectina do Quiabo (*Abelmoschus esculentus*) como marcador da célula espermática ovina

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 12/02/2016

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Carine Dahl Corcini (orientadora), Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)

Dra. Ligia Margareth Pegoraro, Doutora em Ciências, pela Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)

Prof^a. Dr^a. Denise Calisto Bongalhardo, PhD Poltry Science pela University of Guelph.

Prof. Dr. Thomaz Lucia Junior, PhD Medicina Veterinária pela University of Minnesota.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Aerton e Soraia, por todo o amor, apoio, educação, carinho, incentivo que a mim foi dado, e ao meu irmão Caio César pelos conselhos e apoio; são meu alicerce, sem eles não conseguiria ter chegado até aqui.

Ao meu namorado, Vinícius, pelo carinho e ombro amigo e por estar sempre presente me incentivando para que este projeto fosse concluído.

À minha orientadora, Carine Dahl Corcini, que tenho grande admiração pela sua vasta experiência, a quem devo meu grande desempenho profissional, que sempre me depositou muita confiança e oportunidades de crescimento profissional.

Às minhas amigas Stela, Yara, Sara e Geórgia, as quais pude contar durante esses 2 anos, sempre ajudando e proporcionando muitos momentos de alegria e conforto.

Ao Grupo ReproPel, pelo convívio e por toda a estrutura disponível para a realização deste projeto.

À Embrapa Clima Temperado pela disponibilidade do espaço cedido para que eu pudesse fazer as coletas dos carneiros.

Às minhas amigas Jéssica, Fernanda, Jenniffer e Natália pela ajuda nos momentos de dificuldade, pelas conversas, apoio e principalmente pela amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Por fim, agradeço à Deus pela minha vida, família, amigos e a todos que me cercam e me querem bem.

Muito Obrigada!

***Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
Acreditar no sonho que se tem
Quem acredita sempre alcança!
(Renato Russo)***

Resumo

SILVA, Alessandra Cardoso. **Uso da lectina do Quiabo (*Abelmoschus esculentus*) como marcador da célula espermática ovina.** 2016. 28f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

As lectinas estão sendo empregadas como marcadores de superfície na membrana plasmática de espermatozoides devido sua ligação ao sacarídeos das mesmas. O objetivo consiste em buscar a localização de ligação e a colaboração da lectina de quiabo (*Abelmoschus esculentus*) nos espermatozoides de ovinos. A lectina de *A. esculentus* foi purificada como o descrito em Soares et al. (2012). Foram utilizados 8 ejaculados de carneiros. As amostras foram diluídas em diluente padrão tris-gema acrescida de diferentes concentrações de lectinas conforme o tratamento: T1 –0 μ g de lectina; T2 1 μ g de lectina; T3 –3 μ g de lectina; T4 –5 μ g de lectina. As amostras foram acondicionadas a 5°C. Para avaliações espermáticas nos períodos 0h, 2hs e 24hs elas eram aquecidas a 37°C. Para as análises de integridade de membrana, mitocôndria, fluidez e ROS, foi utilizada a citometria de fluxo. Para avaliação da cinética dos espermatozoides, foi utilizado o sistema Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA). A marcação da lectina na célula espermática foi feita com FITC e observada através do Microscópio Confocal Invertido de Varredura a Laser e observamos que a fluorescência foi detectada na peça intermediária do espermatozoide. Em nenhum período de acondicionamento foi observada diferença em relação a integridade de membrana, mitocôndria e fluidez espermática. No período de 0 h na cinética espermática o deslocamento e a velocidade foram inferiores no T4 do que no T3 ($P < 0,05$). Na avaliação de 2 hs o T2 foi superior aos demais tratamentos no deslocamento e velocidade espermática ($P < 0,05$). Após acondicionamento por 24 h a 5°C a cinética espermática foi superior no T3 em relação ao T4 não diferindo dos demais tratamentos. Este achado permite que a avaliação seminal possa ser realizada até 24 h sem perdas nas características seminais quando for adicionado com até 3 μ g de lectina a 5 °C. Além de evidenciar que seu sítio de ligação é na peça intermediária de espermatozoides ovinos.

Palavras-chave: lectina; ovinos; *Abelmoschus esculentus*; FITC

Abstract

SILVA, Alessandra Cardoso. **Use of Okra lectin (*Abelmoschus esculentus*) as a marker of sperm cells ovine.** 2016. 28f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

The lectins are employed as surface markers in the plasma membrane of spermatozoa due to its binding to saccharides thereof. The aim is to seek the connection location and the collaboration of the lectin quiado (*Abelmoschus esculentus*) in sperm sheep. The lectin *A. esculentus* was purified as described in Smith et al. (2012). 8 ejaculates of ovines were used. The samples were diluted in Tris-egg yolk pattern plus diluent different concentrations of lectins according to treatment: T1 -0 μ g lectin; T2 1 μ g lectin; T3 -3 μ g lectin; T4 -5 μ g lectin. The samples were stored at 5°C. For reviews on sperm periods 0h, 2h and 24 hours they were heated to 37°C. For the analysis of membrane integrity, mitochondria, fluidity and ROS, we used flow cytometry. To evaluate the kinetics of sperm cells, we used the Computer-Assisted Sperm Analysis system (CASA). The marking of the lectin in the sperm cell was made with FITC and observed by Confocal Microscope Inverted Scanning Laser and observed that the fluorescence was detected in the intermediate part of the spermatozoon. In no conditioning period difference was observed in relation to membrane integrity, mitochondria and sperm flow. At 0 hour period in sperm kinetic displacement and the speed they were lower T4 than in T3 (P <0.05). In the assessment of 2 hours T2 was higher than others in the displacement and sperm velocity (P <0.05). After conditioning for 24 h at 5°C sperm kinetics was higher in T3 compared to T4 not differing from the other treatments. This finding allows that seminal assessment can be made up to 24 hours without loss in the seminal characteristics when added up to 3 μ g lectin to 5°C. In addition to evidence that its binding site is in the middle piece of sperm ovines.

Keywords: lectin; ovine; *Abelmoschus esculentus*; FITC

Lista de Figuras

- Figura 1 Marcação do DNA das células espermáticas de ovinos com Hoechst 44432, na escala de 20 μm , utilizando o Microscópio Confocal Invertido de Varredura a Laser..... 20
- Figura 2 Marcação da peça intermediária das células espermáticas de ovinos com a lectina *Abelmoschus esculentus* conjugada ao FITC, na escala de 20 μm , utilizando o Microscópio Confocal Invertido de Varredura a Laser..... 21
- Figura 3 Marcação das células espermáticas de ovinos na peça intermediária com a lectina *Abelmoschus esculentus* conjugada ao FITC e a marcação do DNA com Hoescht 44432 na escala de 20 μm , utilizando o Microscópio Confocal Invertido de Varredura a Laser..... 21

Lista de Tabelas

Tabela 1	Média ± Erro Padrão por tratamento dos parâmetros analisados de integridade de membrana, funcionalidade mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e fluidez de membrana nos diferentes tempos de acondicionamento a 5°C (n=8).....	16
Tabela 2	Média ± Erro Padrão por tratamento dos parâmetros analisados de motilidade total (Mot Total), motilidade progressiva (Mot Prog), distância média percorrida (DAP), distância curvilínea (DCL), distância retilínea (DSL), velocidade curvilínea (VCL), velocidade retilínea (VSL), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), oscilação (WOB), deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento cruzado (BCF), no tempo 0h (n=8).....	17
Tabela 3	Média ± Erro Padrão por tratamento dos parâmetros analisados de motilidade total (Mot Total), motilidade progressiva (Mot Prog), distância média percorrida (DAP), distância curvilínea (DCL), distância retilínea (DSL), velocidade curvilínea (VCL), velocidade retilínea (VSL), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), oscilação (WOB), deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento cruzado (BCF), no tempo 2hs (n=8).....	18
Tabela 4	Média ± Erro Padrão por tratamento dos parâmetros analisados de motilidade total (Mot Total), motilidade progressiva (Mot Prog), distância média percorrida (DAP), distância curvilínea (DCL), distância retilínea (DSL), velocidade curvilínea (VCL), velocidade retilínea (VSL), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), oscilação (WOB), deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento cruzado (BCF), no tempo 24hs (n=8).....	19

Sumário

1 Introdução.....	10
2 Metodologia.....	12
3 Resultados.....	16
4 Discussão.....	22
5 Conclusão.....	24
6 Considerações Finais.....	25
Referências.....	26

1 Introdução

Lectinas são definidas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que têm especificidade por resíduos terminais ou subterminais de carboidratos. A principal característica desta classe de proteínas é sua habilidade de interagir com carboidratos e desta forma combinar-se com glicocomponentes presentes na superfície de células e tecidos provenientes dos mais diversos seres vivos (Guzmán - Partida et al., 2004). O principal critério para uma proteína ser considerada uma lectina é sua habilidade de se ligar a um carboidrato, mais frequentemente um oligossacarídeo (Lis & Sharon, 1998). Estas proteínas participam na comunicação celular, desenvolvimento, defesa do hospedeiro, inflamação, metástase de tumor, aglutinação de eritrócitos e de linfócitos, e inibição de bactérias e fungos (Cavada et al., 2001).

As lectinas estão sendo empregadas como marcadores de superfície na membrana plasmática de espermatozoides devido sua ligação ao sacarídeos das mesmas. O conhecimento do padrão de ligação de lectinas em oligossacarídeos de membrana em espermatozoides pode fornecer informações úteis sobre a biologia reprodutiva. Além disso, a ligação de lectinas pode ser uma ferramenta útil para avaliar a capacitação e a reação acrossômica dos espermatozoides (Desantis et al., 2010).

Segundo Kaur et al, (2006) apesar da grande quantidade de informação disponível sobre sequência e especificidade de lectinas, relativamente pouco é conhecido sobre seu significado biológico. O papel fisiológico das lectinas de plantas ainda é incerto. Muitos estudos são desenvolvidos com o intuito de revelar os possíveis papéis desempenhados por essas proteínas na planta, porém nenhum resultado ainda é conclusivo. Apesar disso, várias evidências indicam que as lectinas podem desempenhar papel de defesa na planta. São as únicas proteínas da planta capazes de reconhecerem e se ligarem a glicoconjugados de outros organismos, presentes na superfície de microrganismos (bactérias e fungos). Além disso, elas acumulam-se em partes da planta mais suscetíveis ao ataque de

organismos e são imprescindíveis para a sobrevivência individual e da espécie, como as sementes (Peumans & Van Damme, 1995).

O *Abelmoschus esculentus* (Malvaceae), mais conhecido como quiabo, é uma planta originária da África e se espalhou por todos os países tropicais, incluindo nordeste do Brasil, sendo um componente comum da dieta nativa (Veloso et al., 1968). Esta planta vem demonstrando que possui atividades antifúngicas (Jayaseelan et al., 2013), antibacteriana e anticancerígenas (Mollick et al., 2015) e além de possibilidades *in vitro* com a cura da doença de Alzheimer (Mairuae et al., 2015) se administrada em quantidades de até 50 µg/mL. Entretanto se administrada em ratos uma quantidade superior a 70mg/Kg num período superior a 4 semanas causa atrofia ou degeneração testicular com redução da produção de espermatozoide e dos hormônios reprodutivos (Olatunji-Bello et al., 2007; Uchenna et al. 2014; Nwoke et al., 2015).

A inseminação artificial é uma valiosa ferramenta para programas de melhoramento genético e conservação de raças em ovinos (Anel et al., 2006). Porém a mesma ainda não é aplicada amplamente devido a algumas limitações como fatores relacionado a anato-fisiologia reprodutiva da fêmea, a técnica de inseminação que não é eficaz com resultados bem variados, além de a utilização de sêmen fresco e refrigerado que apresenta como principal limitante o curto período de viabilidade do sêmen. O sêmen congelado de ovinos apresenta como fatores limitantes os baixos índices de fertilidade na inseminação intra cervical, os quais de acordo com Aisen (2001) variam entre 8-30%.

Nesse contexto, o presente estudo consiste em avaliar o efeito da lectina do quiabo, *Abelmoschus esculentus*, e buscar o sítio de ligação desta lectina conjugada ao FITC, na célula espermática de ovinos.

2 Metodologia

2.1 Lectina

A lectina de *Abelmoschus esculentus* foi purificada como o descrito em Soares et al. (2012). Resumidamente, as sementes maduras de *Abelmoschus esculentus* foram trituradas em um pó fino usando um moinho eléctrico (Wiley), acoplado com um peneiro de 60 mesh. A farinha foi desengordurada com n-hexano e o pó resultante foi extraída à temperatura ambiente por agitação contínua, durante 3 h com uma solução de 1:10 (w / v) 0,05 M de Tris-HCl, pH 7,4, e NaCl 0,15 M. Após centrifugação a 8000 g durante 30 min, a fração insolúvel foi descarregada e o sobrenadante foi precipitado com sulfato de amónio a uma saturação de nível 30/60 durante 4 h a 5°C antes da centrifugação a 8000 g durante 20 min; o sedimento foi suspenso, dialisado exaustivamente com tampão de fosfato 0,02 M, pH 7,5 e aplicado a uma coluna de cromatografia de permuta iónica (DEAE-Sephacel, 9 2,0 20 cm) previamente equilibrada. As proteínas absorvidas foram eluídas utilizando um gradiente linear de 0-1,0 M de NaCl em tampão de PBS. A eluição foi monitorizada a 280 nm, e as frações de 1,5 mL foram testadas quanto a atividade hemaglutinante em eritrócitos humanos e de coelho.

Para as experiências, a 1mg da lectina foi diluída em 1ml de PBS.

2.2 Coleta do Sêmen

Foram utilizados como doadores de sêmen 8 carneiros com fertilidade conhecida, e clinicamente saudáveis, dos quais 4 estavam alojados em instalações do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas - UFPel e os 4 restantes alojados na Embrapa Clima Temperado, sob mesmas condições de manejo e alimentação. Cada um dos animais foi submetido a somente uma coleta de sêmen, através do método de coleta por vagina artificial em presença da fêmea (Evans & Maxwell, 1987), totalizando 8 ejaculados. As coletas foram realizadas em dezembro de 2014.

2.3 Preparação das Amostras

As amostras foram encaminhadas para o laboratório do grupo de pesquisa ReproPel e foram diluídas na proporção de 1:1. As amostras foram diluídas em diluente padrão tris-gema composto de 3,63g de TRIS, 1g de glicose, 1,96g de ácido cítrico, 0,06g de penicilina G, 0,1g de estreptomicina, 5mL de glicerol, 15mL de gema de ovo e 100mL água bidestilada (Salamon & Maxwell, 2000), acrescida de diferentes concentrações de lectinas conforme o tratamento: T1 –0µg de lectina; T2 1µg de lectina; T3 –3µg de lectina; T4 –5µg de lectina. Para as análises, as amostras foram realizadas em 3 momentos: com as amostras frescas 0h, em 2hs e em 24hs. As amostras foram armazenadas a 5°C, e a cada momento para realização das análises elas eram aquecidas a 37°C por 10 min.

2.4 Citometria de Fluxo

Para a citometria de fluxo foi utilizada Attune Acoustic Focusing® (Life Technologies) com os lasers azul (488 nm) e violeta (405 nm). Os resultados foram analisados utilizando o programa Attune Cytometric Software v 2.1. Para a detecção de populações de células em todas as análises, as células foram coradas com Hoechst 33342 e a população foi detectado pelo tubo fotomultiplicador (PMT) VL1 (450/40 nm) e as células não coradas foram eliminadas com base em diagramas de dispersão (Nagy et al, 2003).

2.4.1 Integridade da Membrana Plasmática

O sêmen (10 µl) foi incubado por 20 minutos a 37°C com a sonda de trabalho contendo 7,3 µM de iodeto de propídio e 20 µM diacetato de carboxifluoresceína . E 5 minutos após era adicionado 16,2 µM de H33342 e realizada a leitura no citômetro de fluxo. Os espermatozoides foram classificados como não lesionados (DCF + / IP), e lesionados (DCF + / IP +; DCF- / IP +; DCF- / IP) (Fernández-Gago et al. 2013; Gillan et. al., 2005).

2.4.2 Fluidez da Membrana Plasmática

As células foram classificadas para alta fluorescência (alta fluidez) e baixa fluorescência (baixa fluidez) (Fernández-Gago et al. 2013). Sendo utilizada a sonda merocianina 540 (2,7 mM) incubada com 10 µL por 37°C durante 20 minutos. Para leitura no citometro foi adicionado H33342 por 5 minutos.

2.4.3 Funcionalidade de Mitochondria

Para esta avaliação utilizou como base o protocolo de Gillan et al. (2005) sendo as amostras de sêmen incubadas em PBS contendo Rhodamine 123 (13.0 μM) e Hoechst 33342 (16.2 μM) Os espermatozoides foram classificados como aqueles com elevada funcionalidade das mitocôndrias (alta de fluorescência, maior acúmulo de rodhamina) e baixa funcionalidade (baixa fluorescência, menor acúmulo de rodhamina)

2.4.4 Produção de espécies reativas de oxigênio intracelulares

Para esta avaliação foram feitas as análises em dois tempos para observar a liberação de ROS (0 e 60 minutos de incubação a 37°C). Inicialmente foram colocados em um eppendorf 10 μl de sêmen juntamente com H₂DCFDA (1 μM) e 16.4 μM de H33342 e feita a leitura no citômetro de fluxo. A partir dessas duas análises foi calculada a média da liberação de ROS das células.

2.5 Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA)

Os parâmetros do CASA que serão utilizados para as avaliações são os que seguem: motilidade total (%), motilidade progressiva (%), distância média percorrida DAP (μm), distância curvilínea DCL (μm), distância retilínea DSL (μm), velocidade curvilínea VCL ($\mu\text{m/s}$), velocidade retilínea VSL ($\mu\text{m/s}$), retilinearidade STR (%), linearidade LIN (%), oscilação WOB (%), deslocamento lateral da cabeça ALH (μm), frequência de batimento cruzado BCF (Hz) (Dziewulska et al 2011). Para as análises foram utilizadas lâminas próprias do CASA, cada lâmina possui 4 espaços são colocados apenas 3 μl e, desta forma, feita as análises pelo sistema CASA.

2.6 Marcação da lectina no sêmen

A marcação da lectina na célula espermática foi feita com FITC e observada através do Microscópio Confocal Invertido de Varredura a Laser, Leica, TCS SP8.

Foi coletado o ejaculado de um macho e diluído na proporção 3:1 em tris gema. Após foi posto em um eppendorf 950 μl de sêmen e 50 μl de lectina, durante 30 minutos foi incubado; depois foi retirado 50 μl de sêmen com lectina e colocado com 50 μl hoescht, o qual marcará o dna das células espermáticas, para incubar por um período de 5 minutos. Logo após, foi adicionado 400 μl de PBS em tubo falcon juntamente com os 100 μl do sêmen com lectina e hoescht para fazer a lavagem em

centrífuga por 5 minutos. Após foi retirado o sobrenadante e adicionado 25 µl de formol salina para matar as células e adicionado 400 µl de PBS e, novamente, centrifugado durante 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e adicionado 500 µl de PBS.

As laminas foram montadas colocando 10 µl de sêmen com lectina centrifugado e feito um esfregaço, esperamos secar, colocamos óleo e observamos no Microscópio Confocal Invertido de Varredura a Laser, Leica, TCS SP8.

2.7 Análise Estatística

Foi realizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Após o teste das dezesseis variáveis somente uma delas (motilidade progressiva) apresentou normalidade.

As variáveis integridade de membrana, integridade de mitocôndria, fluidez de membrana, ROS, DSL, DCL, DAP, VSL, VCL, STR, LIN, WOB, ALH e BCF, foram transformadas em logaritmos, tendo os resultados na escala original.

Já as variáveis de motilidade total, DSL, DCP, DAP, VSL, VCL, VAP, STR, LIN, WOB, ALH e BCF, foram transformadas em arco-seno. Foi feita a análise de variância com medidas repetidas, sendo que o efeito individual dos machos foi agrupado ao efeito das coletas. A comparação das médias foi realizada pelo Teste de Tukey.

Todas as análises foram realizadas de software Statistix 10.

3 Resultados

Em nenhum período de acondicionamento foi observada diferença em relação a integridade de membrana, mitocôndria e fluidez espermática em relação aos tratamentos utilizados (Tabela 1).

Tabela 1. Média \pm Erro Padrão por tratamento dos parâmetros analisados de integridade de membrana, funcionalidade mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e fluidez de membrana nos diferentes tempos de acondicionamento a 5°C (n=8).

Parâmetros	Tempo	TG Controle	TG 1 μ g	TG 3 μ g	TG 5 μ g
Integridade de Membrana (%)	0h	77.6 \pm 2.6 ^A	76.5 \pm 2.5 ^A	72.6 \pm 3.9 ^A	70.6 \pm 2.8 ^A
	2h	70.2 \pm 3.6 ^A	69.5 \pm 2.6 ^A	72.7 \pm 3.5 ^A	69.1 \pm 4.8 ^A
	24h	69,5 \pm 2,5 ^A	64,7 \pm 2,9 ^A	67,6 \pm 3,0 ^A	64,1 \pm 7,0 ^A
Funcionalidade Mitocondrial (%)	0h	80.7 \pm 6.6 ^A	79.0 \pm 7.5 ^A	80.3 \pm 6.6 ^A	81.1 \pm 6.9 ^A
	2h	77.2 \pm 7.5 ^A	76.6 \pm 7.1 ^A	76.8 \pm 6.6 ^A	78.5 \pm 7.2 ^A
	24h	73,6 \pm 6,7 ^A	74,5 \pm 6,7 ^A	75,1 \pm 6,9 ^A	76,4 \pm 7,1 ^A
ROS (MIF)	0h	457572 \pm 10004 ^A	49017 \pm 11505 ^A	46265 \pm 10647 ^A	47206 \pm 10471 ^A
	2h	28117 \pm 7164.7 ^A	31468 \pm 10158 ^A	32160 \pm 9251.7 ^A	31823 \pm 9188.7 ^A
	24h	25311 \pm 4699,2 ^A	27755 \pm 6330,4 ^A	32888 \pm 9107,7 ^A	33097 \pm 10506 ^A
Fluidez de Membrana (%)	0h	73.5 \pm 3.6 ^A	73.8 \pm 3.2 ^A	72.4 \pm 3.9 ^A	69.6 \pm 4.1 ^A
	2h	56.7 \pm 6.9 ^A	59.9 \pm 6.3 ^A	57.4 \pm 6.5 ^A	60.4 \pm 5.7 ^A
	24h	49,3 \pm 7,0 ^A	48,4 \pm 7,8 ^A	50,5 \pm 7,8 ^A	49,1 \pm 8,6 ^A

^{A,B} Letras diferentes na mesma linha significa diferença estatística pelo teste Tukey (P<0,05)

*TG Controle: Tratamento com Tris-Gema sem adição da lectina.

*TG 1 μ g: Tratamento com 1 μ g de lectina

*TG 3 μ g: Tratamento com 3 μ g de lectina

*TG 5 μ g: Tratamento com 5 μ g de lectina

Na tabela 2, no tempo 0h, os parâmetros DSL, DAP, VSL, VAP, STR, BCF obtiveram resultados inferiores no T4 do que no T3. E os parâmetros de motilidade total e motilidade progressiva, o T1 não obteve bons resultados quando comparados ao T2 e T3 ($P < 0,05$).

Em relação a tabela 3, apenas os parâmetros de distância e velocidade apresentaram diferença estatística no qual o T2 foi o tratamento mais eficiente no tempo de 2hs de armazenamento à 5°C ($P < 0,05$).

Já na tabela 4, com 24hs de acondicionamento a 5°C, a cinética espermática foi superior no T3 em relação ao T4 não diferindo dos demais tratamentos.

Tabela 2. Média \pm Erro Padrão por tratamento dos parâmetros analisados de motilidade total (Mot Total), motilidade progressiva (Mot Prog), distância média percorrida (DAP), distância curvilínea (DCL), distância retilínea (DSL), velocidade curvilínea (VCL), velocidade retilínea (VSL), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), oscilação (WOB), deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento cruzado (BCF), no tempo 0h (n=8).

Parâmetros	TG Controle	TG 1 μ g	TG 3 μ g	TG 5 μ g
Mot Total (%)	53.0 \pm 3.6 ^B	65.8 \pm 3.1 ^A	67.7 \pm 3.4 ^A	64.4 \pm 2.6 ^{AB}
Mot Prog (%)	50.5 \pm 3.7 ^B	63.6 \pm 3.1 ^A	65.7 \pm 3.5 ^A	61.1 \pm 2.6 ^{AB}
DAP (μm)	44.0 \pm 1.7 ^{AB}	44.0 \pm 1.6 ^{AB}	48.9 \pm 1.7 ^A	42.0 \pm 1.4 ^B
DSL (μm)	33.7 \pm 1.7 ^{AB}	33.6 \pm 1.8 ^{AB}	38.5 \pm 1.5 ^A	30.0 \pm 1.5 ^B
DCL (μm)	79.2 \pm 3.2 ^A	80.4 \pm 3.0 ^A	87.6 \pm 3.5 ^A	78.1 \pm 2.4 ^A
VAP (μm/s)	99.2 \pm 3.9 ^{AB}	100.6 \pm 38 ^{AB}	111.8 \pm 4.0 ^A	96.5 \pm 3.6 ^B
VSL (μm/s)	76.1 \pm 3.9 ^{AB}	76.5 \pm 4.2 ^{AB}	88.0 \pm 3.5 ^A	69.1 \pm 3.7 ^B
VCL (μm/s)	177.8 \pm 7.1 ^A	183.3 \pm 7.0 ^A	199.9 \pm 8.1 ^A	178.7 \pm 6.0 ^A
STR (%)	0.76 \pm 0.01 ^{AB}	0.75 \pm 0.02 ^{AB}	0.78 \pm 0.01 ^A	0.71 \pm 0.02 ^B
LIN (%)	0.44 \pm 0.02 ^A	0.43 \pm 0.02 ^A	0.44 \pm 0.01 ^A	0.39 \pm 0.02 ^A
WOB (%)	0.6 \pm 0.01 ^A	0.6 \pm 0.01 ^A	0.6 \pm 0.01 ^A	0.5 \pm 0.01 ^A
ALH (μm)	4.2 \pm 0.2 ^A	4.5 \pm 0.2 ^A	4.4 \pm 0.2 ^A	4.5 \pm 0.2 ^A
BCF (Hz)	37.6 \pm 0.8 ^{AB}	36.9 \pm 0.9 ^B	40.3 \pm 0.7 ^A	36.0 \pm 0.7 ^B

^{ABC} Apresentaram diferença estatística pelo teste Tukey ($P < 0.05$).

*TG Controle: Tratamento com Tris-Gema sem adição da lectina.

*TG 1 μ g: Tratamento com 1 μ g de lectina

*TG 3 μ g: Tratamento com 3 μ g de lectina

*TG 5 μ g: Tratamento com 5 μ g de lectina

Tabela 3. Média \pm Erro Padrão por tratamento dos parâmetros analisados de motilidade total (Mot Total), motilidade progressiva (Mot Prog), distância média percorrida (DAP), distância curvilínea (DCL), distância retilínea (DSL), velocidade curvilínea (VCL), velocidade retilínea (VSL), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), oscilação (WOB), deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento cruzado (BCF), no tempo 2hs.

Parâmetros	TG Controle	TG 1 μ g	TG 3 μ g	TG 5 μ g
Mot Total (%)	71.5 \pm 2.7 ^A	67.2 \pm 2.8 ^A	62.6 \pm 3.1 ^A	63.5 \pm 3.2 ^A
Mot Prog (%)	67.9 \pm 2.8 ^A	64.7 \pm 3.0 ^A	59.3 \pm 3.1 ^A	59.7 \pm 3.3 ^A
DAP (μm)	44.0 \pm 1.4 ^B	50.3 \pm 0.8 ^A	44.5 \pm 1.4 ^B	44.8 \pm 1.6 ^B
DSL (μm)	33.4 \pm 1.4 ^B	40.5 \pm 1.1 ^A	35.0 \pm 1.5 ^B	35.1 \pm 1.5 ^B
DCL (μm)	78.1 \pm 2.7 ^B	90.2 \pm 2.3 ^A	78.0 \pm 2.5 ^B	79.3 \pm 2.7 ^B
VAP (μm/s)	102.2 \pm 3.3 ^B	117.3 \pm 1.8 ^A	104.2 \pm 3.5 ^B	103.3 \pm 3.6 ^B
VSL (μm/s)	77.4 \pm 3.1 ^B	94.2 \pm 2.3 ^A	81.9 \pm 3.5 ^B	81.1 \pm 3.4 ^B
VCL (μm/s)	181.2 \pm 6.5 ^B	209.7 \pm 5.0 ^A	183.0 \pm 6.2 ^B	182.8 \pm 6.3 ^B
STR (%)	0.75 \pm 0.02 ^A	0.80 \pm 0.01 ^A	0.78 \pm 0.01 ^A	0.78 \pm 0.01 ^A
LIN (%)	0.44 \pm 0.02 ^A	0.45 \pm 0.02 ^A	0.45 \pm 0.01 ^A	0.44 \pm 0.01 ^A
WOB (%)	0.57 \pm 0,01 ^A	0.56 \pm 0,01 ^A	0.57 \pm 0,01 ^A	0.56 \pm 0,01 ^A
ALH (μm)	4.45 \pm 0,1 ^A	4.75 \pm 0,1 ^A	4.37 \pm 0,2 ^A	4.39 \pm 0,1 ^A
BCF (Hz)	38.7 \pm 0,7 ^A	38.4 \pm 0.6 ^A	39,1 \pm 0.7 ^A	38.9 \pm 0,6 ^A

^{ABC} Apresentaram diferença estatística (P<0.05).

*TG Controle: Tratamento com Tris-Gema sem adição da lectina.

*TG 1 μ g: Tratamento com 1 μ g de lectina

*TG 3 μ g: Tratamento com 3 μ g de lectina

*TG 5 μ g: Tratamento com 5 μ g de lectina

Tabela 4. Média \pm Erro Padrão por tratamento dos parâmetros analisados de motilidade total (Mot Total), motilidade progressiva (Mot Prog), distância média percorrida (DAP), distância curvilínea (DCL), distância retilínea (DSL), velocidade curvilínea (VCL), velocidade retilínea (VSL), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), oscilação (WOB), deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento cruzado (BCF), no tempo 24hs.

Parâmetros	TG Controle	TG 1 μ g	TG 3 μ g	TG 5 μ g
Mot Total (%)	50.1 \pm 2.2 ^A	44.6 \pm 2.1 ^{AB}	44.2 \pm 3.5 ^{AB}	37.1 \pm 2.0 ^B
Mot Prog (%)	45.0 \pm 2.4 ^A	40.6 \pm 2.2 ^{AB}	40.0 \pm 3.8 ^{AB}	32.5 \pm 2.2 ^B
DAP (μm)	39.8 \pm 1.5 ^A	36.3 \pm 0.7 ^A	39.1 \pm 2.1 ^A	35.7 \pm 1.1 ^A
DSL (μm)	23.6 \pm 1.3 ^B	23.3 \pm 0.6 ^B	29.1 \pm 1.8 ^A	24.7 \pm 1.4 ^{AB}
DCL (μm)	81.3 \pm 2.0 ^A	74.6 \pm 1.5 ^{AB}	74.1 \pm 3.8 ^{AB}	70.7 \pm 1.7 ^B
VAP (μm/s)	91.2 \pm 2.9 ^A	81.6 \pm 1.5 ^{AB}	87.9 \pm 4.8 ^{AB}	80.2 \pm 2.1 ^B
VSL (μm/s)	54.2 \pm 2.9 ^B	52.7 \pm 1.4 ^B	65.7 \pm 4.1 ^A	55.3 \pm 2.8 ^{AB}
VCL (μm/s)	185.4 \pm 4.6 ^A	166.9 \pm 3.0 ^{AB}	165.9 \pm 8.9 ^{AB}	158.6 \pm 3.7 ^B
STR (%)	0.59 \pm 0.02 ^C	0.64 \pm 0.01 ^{BC}	0.74 \pm 0.02 ^A	0.68 \pm 0.02 ^{AB}
LIN (%)	0.29 \pm 0.01 ^C	0.31 \pm 0.01 ^{BC}	0.40 \pm 0.02 ^A	0.35 \pm 0.02 ^{AB}
WOB (%)	0.48 \pm 0.02 ^B	0.48 \pm 0.01 ^B	0.54 \pm 0.01 ^A	0.50 \pm 0.01 ^{AB}
ALH (μm)	5.0 \pm 0.1 ^A	4.6 \pm 0.05 ^{AB}	4.0 \pm 0.2 ^C	4.3 \pm 0.2 ^{BC}
BCF (Hz)	32.7 \pm 0.7 ^B	32.3 \pm 0.4 ^B	37.0 \pm 1.2 ^A	33.4 \pm 0.6 ^B

^{ABC} Apresentaram diferença estatística (P<0.05).

*TG Controle: Tratamento com Tris-Gema sem adição da lectina.

*TG 1 μ g: Tratamento com 1 μ g de lectina

*TG 3 μ g: Tratamento com 3 μ g de lectina

*TG 5 μ g: Tratamento com 5 μ g de lectina

3.1 Marcação da Lectina na Célula Espermática

Os resultados foram obtidos através do Microscópio Confocal Invertido de Varredura a Laser, Leica, TCS SP8, o qual podíamos observar a fluorescência na peça intermediária do espermatozoide.

Foi feita uma foto negativa no qual foi corado somente o DNA das células com o corante H33342, como mostra a figura 3. Na figura 4, podemos observar a ligação da lectina de *Abelmoschus esculentus* na peça intermediária dos espermatozoides; e na figura 5 foi feita a marcação com a lectina e utilizou-se também o H33342, para

que possamos ter certeza de que esta lectina não se liga em outra parte dos espermatozoides, somente na peça intermediária.

Figura 1. Marcação do DNA das células espermáticas de ovinos com Hoechst 44432, na escala de 20 μm , utilizando o Microscópio Confocal Invertido de Varredura a Laser.

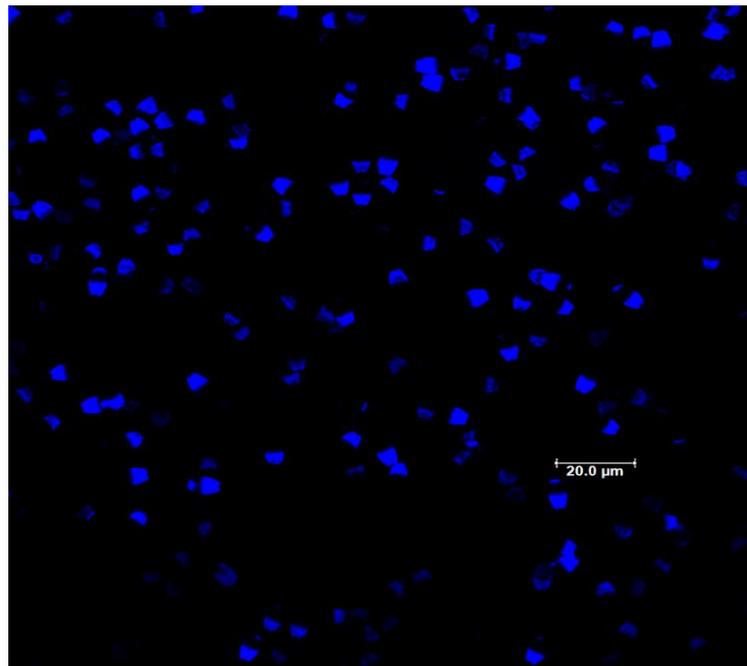


Figura 2. Marcação da peça intermediária das células espermáticas de ovinos com a lectina *Abelmoschus esculentus* conjugada ao FITC, na escala de 20 μm , utilizando o Microscópio Confocal Invertido de Varredura a Laser.

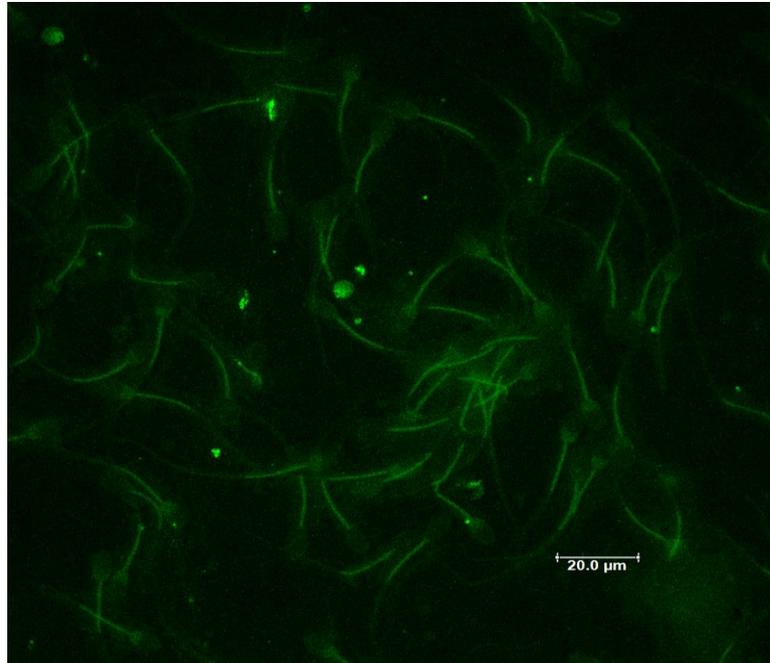
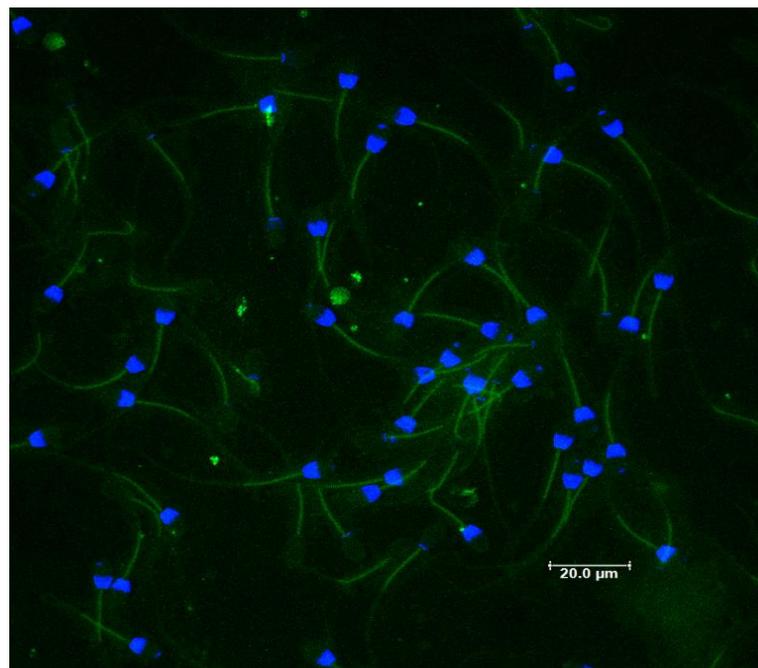


Figura 3. Marcação das células espermáticas de ovinos na peça intermediária com a lectina *Abelmoschus esculentus* conjugada ao FITC e a marcação do DNA com Hoescht 44432 na escala de 20 μm , utilizando o Microscópio Confocal Invertido de Varredura a Laser.



4 Discussão

A afinidade da lectina de *Abelmoschus esculentus* pela peça intermediária do espermatozoide ovino é muito importante pois ela poderá permitir a sua utilização como um futuro marcador ou um aditivo de diluente para proteção desta estrutura celular. A importância de verificar a qualidade da peça intermediária é devida neste local estarem localizadas as mitocôndrias. As mesmas são responsáveis pela respiração celular e pela produção de ATP fornecendo energia para a movimentação do flagelo e consequentemente condução do espermatozoide através do trato genital feminino. Falta de estudos que relatam algum tipo de lectina que tenha afinidade pela peça intermediária como o que foi encontrado em nosso trabalho, o que o torna inédito.

Kaefer et al., (2013) avaliaram a marcação com FITC das lectinas de ConA, ConBr e ConBol em células espermáticas de bovinos congeladas. Todas as lectinas testadas se ligaram na cabeça do espermatozoide, principalmente ao acrossoma. Sendo que FITC ConA mostrou maior intensidade da fluorescência na região do acrossoma, o que poderia estar associada com células capacitadas após o processo de descongelamento; ao contrário de FITC ConBol que mostrou baixa intensidade de fluorescência no acrossoma. Já FITC ConBr exibiu um padrão de fluorescência fragmentado no acrossoma.

Na avaliação inicial as células estavam a 37°C, portanto a lectina passou a atuar eficientemente nas células, sem mostrar danos, até a concentração de 3 µg. Pode-se atribuir isso a lectina de *Abelmoschus esculentus* atuar como uma proteína de armazenamento de nitrogênio, sendo um sítio de ligação a hidratos de carbono, que podem ser utilizados como proteínas de defesa passiva.

A possibilidade de armazenar as células espermáticas a 5°C em diluente contendo a lectina sem perdas na qualidade seminal, permite que a mesma possa ser utilizada como marcador de qualidade seminal, e sua leitura poderá ocorrer até 24 hs após a coleta. Esse fator é extremamente importante, pois na ovinocultura não se tem centrais de coleta de sêmen, o que dificulta as avaliações com as demais sondas devido a leitura das variáveis ocorrer no máximo até 3 hs. Desta forma, a

utilização da lectina *Abelmoschus esculentus* pode ser promissora como outra variável a ser analisada para os exames de andrologia.

A laterização da cabeça tem correlação negativa com a distância percorrida ($R = -0,71$), então quanto maior for a amplitude de laterização da cabeça, menor será a distância percorrida pelo espermatozoide. É o que podemos observar nos resultados, o qual mostra que em todos os períodos de tempo das análises o parâmetro ALH apresentou resultados bem menores que os outros parâmetros. Se aumenta a amplitude de laterização da cabeça está gastando mais energia para a laterização e a distância dele percorrida, por isso as distâncias são menores

Os parâmetros integridade de membrana, integridade de mitocôndria, fluidez de membrana e ROS não apresentaram diferença estatística tanto entre os tratamentos quanto nos períodos de tempo das análises, pois devido a função de defesa da lectina, ela acaba por proteger as estruturas internas das células espermáticas sem causar danos. Desta forma, concluímos que a lectina de *Abelmoschus esculentus* não danifica as células espermáticas de ovinos, quando utilizadas até uma concentração de $5\mu\text{g}$.

5 Conclusão

Foi possível verificar que a marcação da lectina extraída da semente tem forte ligação pelas glicoproteínas da peça intermediária da célula espermática de ovino sem causar danos a mesma.

6 Considerações Finais

Na avaliação da cinética dos espermatozoides, os resultados obtidos nos mostram que as células se mantiveram em boas condições quando utilizadas até 3 μ g, sem danos nas estruturas internas, como apresentado nos resultados de integridade de membrana, funcionalidade de mitocôndria, fluidez de membrana e ROS.

Com os resultados encontrados, a lectina é uma proteína de defesa a qual protege as células contra ações do ambiente externo. Devido a sua marcação na peça intermediária da célula espermática, pode-se prever que esta lectina possa ser utilizada para conservar amostras seminais por períodos mais longos (até 24hs) agindo defensivamente na célula. Porém, ainda são necessários dados *in vivo* para isso se concretizar.

Referências

AISEN, E.G. **Criopreservación de semen ovino: Efecto de diluyentes hipertônicos sobre la integridad espermática**. 2001.120f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade de Buenos Aires.

ANEL, L.; et al. Improvement strategies in ovine artificial insemination. **Reproduction Domestic Animal**, v.2, p.30-42, 2006.

CAVADA, B.S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T.B.; BARRAL NETTO, M. Do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the *Diocleinae subtribe* lectins. **Current Protein & Peptide Science**, v.2, p.123–135, 2001.

DESANTIS, S.; VENTRIGLIA, G.; ZIZZA, S.; NICASSIO, M.; VALENTINI, L.; DI, S.A.; ET AL. Lectin-binding sites on ejaculated stallion sperm during breeding and non-breeding periods. **Theriogenology**, v.73, p.1146-53, 2010.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. **Tropical Animal Health and Production**, v.23, n.2; p.114, 1991.

FERNÁNDEZ-GAGO, R.; DOMÍNGUEZ, J.C.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: A flow cytometry study **Theriogenology**, v.80, p.400–410, 2013.

GILLAN L.; EVANS G.; MAXWELL W.M.C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v.63, p.445–457, 2005.

GUZMÁN-PARTIDA, A. M.; ROBLES-BURGUEÑO, M. R.; ORTEGA-NIEBLAS, M.; VÁZQUEZ-MORENO, I. Purification and characterization of complex carbohydrate specific isolectins from wild legume seeds: *Acacia constricta* is (vinorama) highly homologous to *Phaseolus vulgaris* lectins. **Biochimie**, v. 86, p. 335-342, 2004.

JAYASEELAN, C.; RAMKUMAR, R.; RAHUMAN, A.A.; PERUMAL, P. Green synthesis of gold nanoparticles using seed aqueous extract of *Abelmoschus*

esculentus and its antifungal activity. **Industrial Crops and Products**, 45; 423-427, 2013.

KAEFER, C.; KOMNINO, E.R.; CAMPOS, V.F.; DE LEON, P.M.; ARRUDA, F.V.S.; NASCIMENTO, K.S.; TEIXEIRA, E.H.; STEFANELLO, F.M.; BARSCHAK, A.G.; DESCHAMPS, J.C.; SEIXAS, F.K.; CAVADA, B.S.; COLARES, T. Binding pattern and toxicological effects of lectins from genus *Canavalia* on bovine sperm. **Reproductive Toxicology**, v. 38, p. 72-80, 2013.

KAUR, M.; SINGH, K.; RUP, P. J.; SAXENA, A. K.; KHAN, R. H.; ASHRAF, M. T.; KAMBOJ, S. S.; SINGH, J. A tuber lectin from *Arisaema helleborifolium* Schott with anti-insect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and anticancer effect on human cancer cell lines. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.445, p.156–165, 2006.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 2, p. 637-674, 1998.

MAIRUAE, N.; CONNOR, J.R.; LEE, S.Y.; CHEEPSUNTHORN, P.; RONGIAROENBUANGAM, W. The effects of okra (*Abelmoschus esculentus* Linn.) on the cellular events associated with Alzheimer's disease in a stably expressed HFE neuroblastoma SH-SY5Y cell line. **Neuroscience Letters**, v.31; n.603; p.6-11, 2015.

MOLLICK, M.R.; RANA, D.; DASH, K.S. CHATTOPADHYAY, S.; BHOWMICK, B. MAITY, B.; MONDAL, D.; PATTANAYAK, S.; ROY, S.; CHAKRABORTY, M.; CHATTOPADHYAY, D. Studies on green synthesized silver nanoparticles using *Abelmoschus esculentus* (L.) pulp extract having anticancer (*in vitro*) and antimicrobial applications. **Arabian Journal of Chemistry** (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.04.033>

NAGY, S.; JANSEN, J.; TOPPER, E.K.; GADELLA, B.M. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. **Biology of Reproduction**. v.68, p.1828-35, 2003.

NWOKE, K.U.; SOMINITARI, A.T.F.; DAPPER, D.V.; IFEDI, C.I. Methanolic extracts of the fruit of *Abelmoschus esculentus* (OKRO) causes increase in the serum concentration of some reproductive hormones and decreases total sperm count in male Albino Wistar rats. **European Journal of Pharmaceutical and Medical Research**, v.2, n.5, p.57-66; 2015.

OLATUNJI-BELLO, I. I.; IJIWOLE, T.; AWOBAJO, F.O. Effects of *Abelmoschus esculentus* (okra) on reproductive functions in male rats. **The FASEB Journal**, 21; 973-978, 2007.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, p. 347-352, 1995.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.77–111, 2000.

SOARES, G.S.F.; ASSREUY, A.M.S.; GADELHA, C.A.A.; GOMES, V.M.; DELATORRE, P.; SIMÕES, R.C.; CAVADA, B.S.; LEITE, J.F.; NAGANO, C.S.; PINTO, N.V.; PESSOA, H.L.F.; SANTI-GADELHA, T. Purification and Biological Activities of *Abelmoschus esculentus* Seed Lectin. **Protein J**, v.31, n.8, p.674-680, 2012.

STATISTIX® 10 Analytical Software. 2010.

UCHENNA, N.K.; NWEZE, K.G.; CHARLES, I.I. Effects of the methanolic extract of *A. esculentus* (L) moench (okra) fruit on the tests and sperm characteristics of male albino wistar rats. **International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research**, v. 2; p. 2686-2690; 2014.

VELOSO, H.P.; GÓES FILHO, L. Fitogeografia Brasileira: classificação fisionômico - ecológica da vegetação Neotropical. In: **Boletim Técnico do Projeto RADAMBRASIL (Série Vegetação)**. Salvador, 1982, p.1-86.