

JERÔNIMO HUGO DE SOUZA

**DILUIDOR QUIMICAMENTE DEFINIDO À BASE DE TRIS-CASEÍNA
NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO**

**GARANHUNS - PE
2021**

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

S729d Souza, Jerônimo Hugo de
Diluidor quimicamente definido à base de tris-caseína na
criopreservação do sêmen caprino / Jerônimo Hugo de Souza. – 2022.
54 f.

Orientadora: Maria Madalena Pessoa Guerra.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Sanidade e
Reprodução de Animais de Produção, Recife, BR-PE, 2021.
Inclui bibliografia.

1. Criopreservação de órgãos, tecidos, etc. 2. Sêmen 3. Caprino
4. Biotecnologia 5. Reprodução animal 6. Gema de ovo
7. Congelamento 8. Criopreservação 9. Caseína I. Guerra, Maria
Madalena Pessoa, orient. II. Título

CDD 636.08926

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

DILUIDOR QUIMICAMENTE DEFINIDO À BASE DE TRIS-CASEÍNA
NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO

JERÔNIMO HUGO DE SOUZA

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Animais de Produção, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Sanidade e Reprodução de Animais de Produção.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Madalena Pessoa Guerra

GARANHUNS - PE
2021

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

DILUIDOR QUIMICAMENTE DEFINIDO À BASE DE TRIS-CASEÍNA
NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO

Dissertação elaborada por:

JERÔNIMO HUGO DE SOUZA

Aprovada em/...../.....

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Madalena Pessoa Guerra
Presidente da banca – UFRPE

Prof. Dr. André Mariano Batista
Membro titular – UFRPE

Prof^a. Dr^a Ellen Cordeiro Bento da Silva
Membro titular – UFRPE

Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro
Membro suplente – UFRPE

**Dedico esta dissertação
aos maiores merecedores dessa conquista,
Meus pais (*Homero e Geovani*),
Minha filha (*Ana Quitéria*),
Meus irmãos,
E a todos que ofereceram suporte e apoio para esta caminhada.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, por todas as conquistas e crescimento pessoal; sei que o Senhor sempre me guiará para os caminhos que são mais certos para mim, que sempre me levará mais longe, para lugares que eu tenha certeza que poderei crescer.

Aos meus Avós paternos, Jerônimo (Seu Nô) e Quitéria (Dona Sinhá) – in memoriam, que tiveram bastante influência na minha infância; os admiro muito e estarão sempre comigo.

Aos meus pais, Homero e Geovaní, não tenho palavras para dizer o quanto sou grato por tudo; por sempre estarem ao meu lado, me apoiando e incentivando; pela formação do meu caráter; e pela coragem herdada para enfrentar a vida de cabeça sempre erguida. Tenho muito orgulho e amor por vocês!

À minha filhinha Ana Quitéria, a coisa mais preciosa do mundo, me mostrou que o amor paterno pode ser maior que tudo. Me ensina muito, me faz um ser humano melhor, é a fonte de toda minha força e por ela nunca vou desistir.

Aos meus irmãos, Homero, Hipólito, Glaubervania e Gerlaine, serei eternamente grato por ter vocês como irmãos; obrigado por todo o apoio e incentivo. Amo vocês!

A toda minha família, pelo apoio, carinho, dedicação, incentivo, e por estarem sempre ao meu lado.

Aos amigos que fizeram dessa caminhada mais leve, divertida e cheia de bons momentos. Obrigado pela grande amizade, apoio e incentivo de cada um de vocês.

À minha namorada, Ariane Cristine, obrigado por estar comigo nessa reta final, pelo carinho, amizade, diversão, companheirismo e amor. Sou muito feliz por ter você ao meu lado.

À Prof^a. Madalena Guerra (orientadora), pela oportunidade, por aceitar me orientar durante esses dois anos, permitindo que eu faça parte dessa grande equipe que constitui o laboratório de andrologia (ANDROLAB).

A todos os componentes do ANDROLAB em especial a Lucia Arruda, Millena Monteiro e Desirée Seal, esse trabalho tem o dedo de cada uma delas e sem isso não teria sido concluído.

A todos os professores que contribuíram para a construção do meu aprendizado e crescimento profissional, em especial aos professores da reprodução, André Mariano, Gustavo Ferrer e Cláudio Coutinho.

Muito obrigado a todos!

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
BSP	Proteínas do plasma seminal
BCF	Frequência de batimento cruzado
HOST	Teste hiposmótico
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
FC	Fosfatidilcolina
FE	Fosfatidiletanolamina
DHA	Docosahexaenoico
AGPI	Ácidos Graxos poli-insaturados
CASA	Sistema Computadorizado de Análise Espermática
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
IP	Iodeto de propídio
LIN	Linearidade
MP	Motilidade progressiva
MT	Motilidade total
PBS	Fosfato salino tamponado
pH	Potencial hidrogeniônico
PNA	<i>Peanut agglutinin</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio
STR	Retilinearidade
VAP	Velocidade média da trajetória
VCL	Velocidade curvilínea
VSL	Velocidade em linha reta
WOB	Índice de oscilação (VAP/VCL)

ZP Zona Pelúcida

RESUMO

Diluidores de sêmen convencionais – à base de leite ou gema de ovo – apresentam problemas por serem produtos biológicos que possuem uma variedade de substâncias, não sendo possível conhecer a sua exata composição, além de haver potencial risco contaminante e de disseminação de microrganismos patógenos. Diluidores contendo apenas componentes químicos conhecidos, com efeitos protetores dos espermatozoides seriam, portanto, uma vantagem. Com isso, objetivou-se elaborar um diluidor quimicamente definido, à base de caseína, bem como avaliar seu efeito e eficácia no processo de congelação de sêmen de reprodutores caprinos. Para tanto, foram utilizados três bodes em idade reprodutiva e as colheitas de sêmen realizadas pelo método de vagina artificial, utilizando uma fêmea como manequim. Foram obtidos oito ejaculados por macho, totalizando 24 ejaculados. Após a colheita, os ejaculados com motilidade superior a 70% foram agrupados em *pools* seminais. Para congelação, foi utilizado diluidor convencional, constituindo o grupo controle (Tris-gema de ovo), assim como diluidor à base de Tris-caseína, em diferentes concentrações (**CAS1**: 0,125g/L; **CAS2**: 0,25g/L; **CAS3**: 0,5g/L), acrescidos de 5% de glicerol. Após diluição (200×10^6 espermatozoides/mL), as palhetas (0,25 mL) identificadas foram congeladas em sistema automatizado e armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C). Após descongelação (37 °C, 30 s), as amostras foram submetidas às análises de cinética (CASA), integridade da membrana plasmática e acrossomal, além do potencial de membrana mitocondrial. Os parâmetros cinéticos não evidenciaram diferença significativa ($P > 0,05$), com exceção da frequência de batimento flagelar (BCF), onde o grupo CAS3 apresentou valor superior ($P \leq 0,05$) ao grupo controle. Quanto às análises de integridade da membrana plasmática, integridade do acrossoma e potencial de membrana mitocondrial, não se observou diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os grupos avaliados. Conclui-se que o diluidor quimicamente definido à base de Tris suplementado com caseína (0,125g/L, 0,25g/L e 0,5g/L) pode ser utilizado para a congelação de sêmen caprino, em virtude de preservar os parâmetros cinéticos, a integridade e a funcionalidade da célula, semelhantes àqueles obtidos com diluidor convencional à base de gema de ovo.

Palavras-chave: congelação, crioprotetor, gema de ovo, caseína.

ABSTRACT

Semen extenders based on milk or egg yolk do not have a standardized composition, which can cause variability in the results obtained, in addition for being biological material, it is able to cause contamination of semen by microorganisms. Therefore, studies on extenders containing only chemical components with protective effects on sperm are necessary. The objective of the present work was to elaborate a chemically defined extender, based on Tris-casein, and to evaluate its effect and efficacy in the goat semen freezing process. For this purpose, three goats of reproductive age were used and semen collections were obtained by the artificial vagina method and one female as dummy. Eight ejaculates were collected per male, totaling 24 ejaculates. After semen collection, the ejaculates that presented motility greater than 70% were grouped in seminal pools. For freezing, a conventional extender was used, constituting the control group (Tris-egg yolk), as well as a extender based on Tris-casein, in different concentrations (CAS1: 0.125g / L; CAS2: 0.25g / L; CAS3: 0.5g / L), added with 5% of glycerol. After dilution (200×10^6 sperm / mL), straws (0.25 mL) were identified and frozen in an automated system and stored in liquid nitrogen (-196°C). After thawing (37°C , 30 s), the samples were submitted to kinetic analysis (CASA), integrity and functionality of the plasma membrane, acrosome integrity and mitochondrial membrane potential. The kinetic parameters did not present significant difference ($P > 0.05$), with an exception of the flagellar beat frequency (BCF), where the CAS3 group had a higher value ($P \leq 0.05$) than the control group. Regarding the integrity and functionality of the plasma membrane, acrosome integrity and mitochondrial membrane potential analysis, there were no significant difference ($P > 0.05$) between the groups evaluated. It can be concluded that the chemically defined extender based on Tris-casein presents as a viable alternative to the conventional diluent based on Tris-egg yolk, used for freezing goat semen.

Keywords: Casein, Crioprotectant, Egg Yolk, Freezing.

SUMÁRIO

	Página
DEDICATÓRIA	
AGRADECIMENTOS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1 Particularidades da criopreservação de sêmen.....	15
3.2 Danos espermáticos causados no processo de congelamento/descongelamento.....	16
3.3 Diluidores.....	17
3.4 Diluidores quimicamente definidos.....	19
3.4.1 Caseína.....	20
3.5 Análise espermática.....	21
3.5.1 Sistema Computadorizado (CASA).....	21
3.5.3 Sondas fluorescentes.....	23
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
5 ARTIGO CIENTÍFICO.....	36
5.1 Diluidor quimicamente definido à base de caseína na congelamento de sêmen caprino.....	36

1 INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen é uma ferramenta importante para a conservação de recursos genéticos. Os bancos de germoplasma, utilizados em conjunto com programas de reprodução, fornecem estratégias promissoras para a preservação de raças ameaçadas de extinção (ARANDO et al., 2017). E quando associada a outras técnicas, como inseminação artificial (IA), inseminação em tempo fixo (IATF) ou produção de embriões *in vitro*, oferece um rápido ganho genético para os animais de produção (CASTRO et al., 2016).

Entretanto, a conservação dos espermatozoides pelo frio pode se tornar um problema, particularmente durante a congelação. Isso porque a congelação determina alterações espermáticas letais ou subletais em níveis ultraestrutural, bioquímico e funcional, que resultam na redução da motilidade, viabilidade e capacidade fertilizante dos espermatozoides (ALCAY et al., 2020). Por conseguinte, torna-se indispensável a realização de mais estudos utilizando as técnicas de criopreservação dos espermatozoides, tendo como finalidade não somente preservar um elevado número de gametas vivos, como também manter a capacidade fertilizante dos mesmos (STORNELLI et al., 2005).

Neste sentido, a escolha correta do diluidor utilizado e sua composição é um fator crucial para a proteção dos espermatozoides, determinando o sucesso da criopreservação (ALCAY et al., 2020). Os diluidores tradicionais para a criopreservação do sêmen caprino incluem a gema de ovo e o leite desnatado, ou sua combinação, porém existem muitas limitações ao seu uso, destacando-se o fato destes constituintes biológicos diferirem entre partidas, bem como propiciarem a contaminação microbiana e a disseminação de patógenos (PURDY, 2006). Além disso, o sêmen caprino possui em seu plasma seminal a enzima Fosfolipase A, que pode interagir com lipídeos da gema de ovo ou triglicerídeos do leite desnatado, causando danos às células espermáticas, reduzindo sua motilidade e vitalidade (LEBOEUF; RESTALL; SALAMON, 2000; ROOF et al., 2012).

Dessa forma, diluidores quimicamente definidos têm sido desenvolvidos a fim de eliminar os problemas anteriormente descritos e permitir o processamento mais adequado e seguro do sêmen. Algumas alternativas para a substituição do leite desnatado e da gema de ovo têm sido relatadas, dentre as quais se pode destacar a lecitina de soja (ALCAY et al., 2017; MEHDIPOUR et al., 2017; NAJAFI et al., 2017; ARAÚJO SILVA et al., 2019), o caseinato

(DA SILVA et al., 2020) e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL; LUNA-OROZCO et al., 2019).

Entre os componentes citados, a caseína tem demonstrado efeito positivo no processo de criopreservação espermática. Sendo o principal componente proteico, a caseína representa 75-80% de todas as proteínas do leite (BATTELIER, 2001), com capacidade de estabilizar as membranas espermáticas e evitar a perda de fosfolipídios, uma vez que competem diretamente com as proteínas plasmáticas seminais, responsáveis pela desestabilização da membrana (BERGERON e MANJUNATH, 2006; BERGERON et al., 2007). Dessa forma, a caseína tem sido responsável pela proteção dos gametas masculinos, mesmo em baixas concentrações no sêmen refrigerado (0,6%) e congelado (1,35%) (LAGARES et al., 2012). Portanto, são necessários estudos sobre sua utilização no processo de criopreservação do sêmen caprino, avaliando seus efeitos e eficácia sobre as células espermáticas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Elaborar um diluidor quimicamente definido, à base de Tris-caseína, para a congelação de sêmen de reprodutores caprinos.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Elaborar diluidor, à base de caseína obtida do leite bovino, a fim de permitir adequada conservação de espermatozoides caprinos, com eliminação dos riscos biológicos e das barreiras sanitárias oriundos do uso de diluidores convencionais (leite desnatado ou Tris-gema de ovo);
- ✓ Verificar a eficácia do diluidor quimicamente definido, à base de caseína sobre os parâmetros cinéticos de espermatozoides caprinos, após congelação-descongelação;
- ✓ Analisar a integridade e funcionalidade da membrana plasmática, integridade do acrossoma, além do potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides caprinos, congelados com diluidor convencional (tris-gema de ovo) ou quimicamente definido, à base de caseína.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Particularidades da criopreservação de sêmen

Na criopreservação, as células espermáticas são mantidas a uma temperatura aproximada de 5 °C no processo de refrigeração, ou a – 196 °C quando congeladas em nitrogênio líquido, com o objetivo de preservar sua integridade e sua fisiologia (ARANDO et al., 2017). Porém, apesar de favorecer a utilização desses gametas por maior período de tempo, diminuir os custos relacionados à manutenção de reprodutores e possibilitar o intercâmbio de material genético entre locais distantes, essa biotécnica acarreta na diminuição da motilidade e viabilidade do gameta (CASTELO et al., 2008; LUNA-OROZCO et al., 2019). Dessa forma, durante a conservação do sêmen pelo frio, o número de células espermáticas danificadas e apoptóticas aumentam drasticamente em relação ao sêmen *in natura*, independente da técnica utilizada (ORTEGA et al., 2003).

A refrigeração do sêmen ocorre em temperaturas que variam de 2 a 15 °C, apesar de ser mais comumente utilizada entre 4 e 5 °C (LUKUSA et al., 2020). Essa técnica tem como princípio básico a redução reversível da motilidade e da atividade metabólica dos espermatozoides, pela diminuição gradativa da temperatura (MACHADO e SIMPLÍCIO, 1995). Segundo Bezerra (2010), a cada 10 °C de diminuição da temperatura, o metabolismo espermático é reduzido à metade; por conseguinte, ao atingir a temperatura de 5 °C, o espermatozoide dispõe de, aproximadamente, 10% de seu metabolismo para sobreviver.

Em contrapartida, a congelação é definida como a manutenção de células em temperatura criogênica (-196 °C) em nitrogênio líquido, a qual permite que todos os processos biológicos e fisiológicos que ocorrem intra- e extracelular sejam reduzidos ou até mesmo interrompidos (TRALDI, 2006; BAKHACH, 2009). Dentre os seus benefícios, encontram-se a conservação e utilização do sêmen por tempo indeterminado, reduzindo riscos e custos com aquisição e transporte de reprodutores, além da rápida difusão genética e formação de bancos de sêmen de alto valor genético (TONIOLLI e CANTANHÊDE, 2019).

Apesar do exposto a cima, o processo de congelação e descongelação induz efeitos deletérios que reduzem a motilidade, integridade da membrana e capacidade de fertilização (ALCAY et al., 2020). Dentre as mudanças na bioquímica e na atividade celular, destacam-se

fragmentação do DNA, danos ao acrossoma e membrana plasmática, resultante de alterações em sua composição, além de ruptura da mitocôndria e indução à apoptose (CHAKRABARTY et al., 2007; ISMAIL et al., 2020). Desta forma, devido às variações de temperatura, é preciso que a criopreservação seja realizada de forma cuidadosa, visando minimizar a ocorrência de lesões irreversíveis nestes gametas, decorrentes do choque térmico (SALAMON e MAXWELL, 2000; WATSON, 2000).

3.2 Danos espermáticos causados no processo de congelação/descongelação

As crioinjúrias se originam da associação entre as mudanças bioquímicas, biofísicas e ambientais, as quais as células são expostas durante o processo de criopreservação (FICKEL et al., 2007). Elas podem ser classificadas, de acordo com sua origem, em primárias, quando oriundas da formação de cristais de gelo durante o choque térmico, e secundárias, quando produzidas pelo efeito solução, que resulta do aumento da concentração de solutos à medida que o gelo é produzido (PESCH e BERGMANN, 2006).

Em termos gerais, amostras de sêmen criopreservadas apresentam diminuição do número de células morfolologicamente normais e alterações nos padrões de motilidade (WATSON, 2000). Tais observações clássicas podem ser tidas como o resultado dos danos estruturais e funcionais sofridos pelos gametas devido a mudanças de temperatura, estresse osmótico e formação de cristais de gelo, ocasionando danos ao DNA e estresse oxidativo. Ainda, modificações ocorrem nas membranas espermáticas, decorrentes de mudanças nas concentrações de cálcio intracelular, que podem justificar o comprometimento da motilidade espermática (SIKKA, 2004; LUNA-OROZCO et al., 2019).

Devido às diversas injúrias sofridas pelos gametas durante o processo de criopreservação, é recomendado que os espermatozoides sejam submetidos a curvas adequadas de congelação, que devem ser lentas o suficiente para evitar a formação de cristais de gelo intracelular e rápida o equivalente para minimizar o contato da célula desidratada com os solutos (HOLT, 2000), uma vez que tais episódios afetam a sobrevivência e a fertilidade espermática (ARRUDA et al., 2007). Assim, a curva de congelação tida como ótima varia entre -30 e -50 °C/min na maioria das espécies animais, com resultados satisfatórios na viabilidade celular (MEDRANO et al., 2009).

Por outro lado, a descongelação é caracterizada por mudanças inversas às ocorridas no processo de congelação, ocorre diminuição da concentração de soluto intracelular e restabelecimento da concentração de água intracelular e do volume celular (HOLT et al., 2000). Entretanto, apesar desta etapa estar associada à restauração dos componentes celulares, ela pode resultar em peroxidação lipídica e danos à membrana, devido à utilização abrupta de oxigênio pelo espermatozoide (BANDAY et al., 2017).

Ainda, durante a descongelação, caso esta seja excessivamente rápida, pode ocorrer a ruptura da membrana plasmática pelo influxo repentino de água para o interior da célula. Por outro lado, a descongelação excessivamente lenta também ocasiona crioinjúrias, em virtude da recristalização, que resultam da junção de pequenos cristais de gelo formando cristais maiores, os quais rompem a membrana plasmática da célula espermática (WATSON, 2000; HOLT, 2000; AITKEN, 2020). Deste modo, assim como as taxas de refrigeração, a descongelação deve ser realizada em um ritmo ideal, de modo que não seja excessivamente rápida ou lenta e, assim, permita que haja o gradual restabelecimento das condições da célula, sem ocasionar crioinjúrias (WATSON, 1995).

Outro ponto importante a ser analisado é o tipo de diluidor utilizado no processo de criopreservação, sendo de fundamental importância a escolha correta, uma vez que sua composição é um fator crucial para a proteção espermática, determinando o sucesso do procedimento.

3.3 Diluidores

Os ejaculados, na maioria dos animais domésticos, contêm mais espermatozoides que o necessário para uma fecundação. Diluindo o sêmen, ele pode ser utilizado para inseminar várias fêmeas. A elevada concentração espermática determina uma intensa atividade metabólica, com rápido acúmulo de catabólitos no plasma seminal, os quais são extremamente prejudiciais à célula (CASTELO, 2008). Portanto, é essencial que o sêmen seja diluído adequadamente para que haja número suficiente de espermatozoides para a fertilização, de modo que uma alta taxa de fertilidade possa ser alcançada usando o menor número de inseminações e de espermatozoides por inseminação (PURDY, 2006; CASTELO, 2008).

A função do diluidor é fornecer aos espermatozoides nutrientes como fonte de energia, proteger contra os danos provocados pelo choque térmico, manter a pressão osmótica e propiciar um ambiente adequado para a sobrevivência espermática. Além de aumentar o volume do ejaculado a fim de obter múltiplas doses inseminantes (VERSTEGEN et al., 2005; CÂMARA et al., 2018).

Em geral, um diluidor para criopreservação de sêmen deve incluir uma substância tampão, como o TRIS ou HEPES; fontes energéticas, como a glicose, frutose ou sacarose; crioprotetores não penetrantes, como leite ou gema de ovo; crioprotetores penetrantes, como glicerol, etileno glicol ou dimetilsulfóxido; sais, como citrato de sódio ou ácido cítrico; bem como antibióticos, sendo mais utilizadas penicilina e estreptomicina (PURDY, 2006; CASTELO et al., 2008).

Os crioprotetores atuam por diversos mecanismos. Os penetrantes aumentam a fluidez da membrana, causam maior desidratação em baixas temperaturas, e diminuem a formação de cristais de gelo intracelulares, que podem danificar a membrana plasmática. Por outro lado, os não penetrantes diminuem a formação de gelo extracelular ao reduzirem a temperatura de congelamento do meio (AMMAN, 1999; HOLT, 2000; AISEN et al., 2002). Portanto, não somente a composição dos diluidores, mas também a natureza dos crioprotetores, influenciam diretamente na ocorrência de danos ocorridos durante a criopreservação dos espermatozoides (BANDAY et al., 2017).

Os principais crioprotetores não-penetrantes utilizados são a gema de ovo e/ou leite desnatado, assim como as lipoproteínas e a lecitina (fosfatidilcolina) da gema de ovo, bem como a lactose e as caseínas, que protegem as células espermáticas contra os danos causados pelo frio (BITTENCOURT et al., 2008; SILVA e GUERRA, 2011; DALMAZZO, 2012). Acredita-se que o leite e a gema de ovo protegem os espermatozoides de forma semelhante, por meio do sequestro de proteínas do plasma seminal (BSP) para prevenir sua ação prejudicial nas membranas espermáticas (BERGERON e MANJUNATH, 2006.; BERGERON et al., 2007; PLANTE et al., 2016). No entanto, seus mecanismos de proteção são diferentes, enquanto na gema de ovo as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são responsáveis pela interação com a BSP, no leite desnatado essa interação envolve a participação de proteínas (MANJUNATH, 2012; DA SILVA et al., 2020).

Entretanto, amostras de sêmen da espécie caprina possuem a particularidade de interação deletéria entre as enzimas presentes no plasma seminal e a gema de ovo e/ou leite encontrados nos diluidores, fato observado em 1957, quando Roy demonstrou que enzimas coaguladoras da gema de ovo (EYCE), liberadas pelas glândulas bulbouretrais do caprino, produzem lisolecitinas e ácidos graxos, quando em contato com os fosfolipídios (lecitina) da gema de ovo, que resulta na coagulação do meio e, conseqüentemente, na morte espermática (MACHADO e SIMPLÍCIO, 1995).

Posteriormente, Nunes (1982) evidenciou também interações deletérias entre as frações proteicas, conhecidas como a glicoproteína SBU-III, produzidas pelas secreções das glândulas bulbouretrais dos caprinos e os triglicerídeos do diluidor à base de leite desnatado. Mais tarde, essas substâncias (EYCE e SBU-III) foram identificadas, como homólogas, sendo conhecidas como Fosfolipase A (LEBOEUF et al., 2000; PUDY, 2006).

Em virtude do exposto, as demandas de substituição de produtos de origem animal por substâncias capazes de conferir crioproteção aos espermatozoides aumentaram nos últimos anos. Isso porque, além do processo deletério do plasma seminal, a gema de ovo aumenta o risco de contaminação microbiana que pode levar à produção de endotoxinas, acarretando redução da fertilidade dos espermatozoides e aumento dos riscos de transmissão de doenças no comércio internacional de sêmen (BOUSSEAU et al., 1998; ANSARI et al., 2016).

3.4 Diluidores quimicamente definidos

Novos diluidores têm sido amplamente estudados e desenvolvidos como alternativas para a substituição dos componentes convencionais. Esses componentes possuem comprovado efeito protetor sobre as células espermáticas, fato que os torna importantes alternativas para a formulação de diluidores seminais (ALCAY et al., 2017; ARAÚJO SILVA et al., 2019; DA SILVA et al., 2020).

Entre as alternativas encontradas, a lecitina de soja (LS) possui um elevado conteúdo de lipoproteína de baixa densidade e, portanto, tem se mostrado viável para a substituição da gema de ovo, utilizada nos diluidores (DALMAZZO, 2012). As vantagens dos diluidores à base de LS foram relatadas com base em resultados de diversos estudos em humanos (JEYENDRAN et

al., 2008), bovinos (AIRES et al., 2003; ARIFIANTINI e YUSUF, 2010; DODARAN et al., 2015), equinos (PAPA et al., 2011), ovinos (CRESPILHO et al., 2012), bubalinos (AKHTER et al., 2012) e caprinos (ARAÚJO SILVA, 2019).

Quanto às LDL, estudos indicam que possuem propriedades crioprotetoras por meio de sua interação com as proteínas BSP, que impede a extração do colesterol e do fosfolípido da membrana espermática. Além de substituir os fosfolípidos que são perdidos ou danificados durante o processamento e formar uma película protetora na superfície do gameta, protegendo-os durante o processo de criopreservação (BERGERON e MANJUNATH, 2006; ANSARI et al., 2016). Portanto, vários estudos tem demonstrado efeito benéfico no uso da LDL em diversas espécies (WILHELM et al., 1996; ZERON et al., 2002; ANSARI et al., 2016; LUNA-OROZCO et al., 2019).

3.4.1 Caseína

O leite desnatado (livre de lipídeos), usado no meio diluidor para proteção dos espermatozoides é tão eficiente quanto o leite integral. Sendo assim, os lipídeos não parecem ser o constituinte responsável pela proteção proporcionada pelo leite (BERGERON e MANJUNATH, 2006). A lactose, que está presente no leite de vaca na concentração de 4,8%, pode melhorar a eficiência dos diluidores, mas não é suficiente para proteger os espermatozoides a 4 °C ou a temperatura abaixo de 0 °C (BERGERON et al., 2007). Outras proteínas, como α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, albumina e lactoferrina, estão solúveis no leite (3,5 g/L) e são chamadas coletivamente de proteínas do soro. No entanto, não está claro se essas proteínas têm algum efeito protetor sobre os espermatozoides durante a criopreservação (BERGERON et al., 2007).

Por sua vez, as micelas de caseína isoladas possuem ação protetora sobre os espermatozoides de garanhões, bodes, carneiros e touros durante armazenamento a 4 – 5 °C, além de apresentar resultados positivos no processo de congelamento de espermatozoides bovinos, na presença de glicerol. Portanto, o componente protetor do leite são as micelas de caseína, que constituem as principais proteínas do leite (BERGERON e MANJUNATH, 2006; BERGERON et al., 2007; DE MENEZES, 2016).

As caseínas são compostas por fosfoproteínas chamadas α 1, α 2, β e κ -caseína, as quais estão presentes no leite na concentração de 27 g/L de proteínas totais, como partículas coloidais heterogêneas, chamadas de micelas de caseína. Basicamente, as micelas de caseína são constituídas por um núcleo hidrofóbico de caseínas α e β , e rodeadas por caseínas κ (DE MENEZES et al., 2016; SILVA et al., 2019).

Sendo assim, o mecanismo de defesa das micelas de caseína presentes no leite desnatado ocorre por meio do sequestro das proteínas BSP. Assim, a proteção dos espermatozoides pelo leite envolve uma interação proteína BSP – caseína (DE MENEZES, 2016; PLANTE et al., 2016). Sugere-se que a interação entre as proteínas BSP e a caseína seja suficientemente forte para permitir o sequestro de proteínas BSP do plasma seminal, impedindo sua ligação à membrana espermática. No entanto, os compostos protetores ainda permitem que algumas proteínas BSP se liguem à membrana espermática e mantenham a fertilidade do espermatozoide (MANJUNATH et al., 2002; BERGERON et al., 2004).

Como os homólogos da BSP foram identificados no sêmen de outras espécies, incluindo os caprinos (GARCIA e GRAHAM, 1987; VILLEMURE et al., 2003), pode-se postular que o mecanismo de proteção dos espermatozoides pela caseína pode ser semelhante para todos os mamíferos (PLANTE et al., 2016). Além disso, as micelas de caseína possuem propriedade de interagir com íons de cálcio. Estes íons são responsáveis por induzir a fosforilação da tirosina para iniciar o processo de capacitação, bem como melhorar a taxa de ligação do espermatozoide à zona pelúcida de oócitos, com consequente aumento da produção de embriões *in vitro* (COUTINHO DA SILVA et al., 2020; DINIZ, et al., 2020).

3.5 Análise espermática

3.5.1 Sistema computadorizado (CASA)

A análise espermática auxiliada por computador se refere a um sistema automatizado, projetado para fornecer informações precisas e significativas sobre a concentração, viabilidade, dinâmica ou morfologia destes gametas, assim como realizar a análise estatística da população espermática. Este sistema tem como base o desenvolvimento de imagens contínuas de

espermatozoides, processamento digital e análise de informações com o auxílio de câmera de vídeo, placa de captura de vídeo, computador (hardware), microscópio de contraste de fase e software específico (LU et al., 2014; AMANN e WABERSKI, 2014; YESTE et al., 2018).

É fundamental para a operação do sistema CASA que as imagens dos gametas possam ser capturadas com clareza pela câmera e convertidas em imagens digitais. Em geral, a coordenada do espermatozoide é determinada pela cabeça ou pelo seu ponto mais brilhante, como ponto de referência. Em seguida, o software inicia a captura de uma imagem contínua da cabeça espermática em uma área selecionada (MORTIMER, 2000). A área é um círculo ao redor da cabeça do espermatozoide, com um raio predeterminado. Depois que as imagens contínuas da cabeça do espermatozoide são localizadas, a coordenada da trajetória espermática pode ser determinada e uma série de valores dinâmicos podem ser calculados. Os parâmetros de movimento são compostos principalmente de três valores: velocidade do movimento espermático, relação da velocidade espermática e características de oscilação do espermatozoide (AMANN e KATZ, 2004; MORTIMER et al., 2015).

Os parâmetros gerados da cinética espermática pelo sistema do CASA são: Motilidade Total (%), referente à população de células que estão se movendo, com uma velocidade mínima determinada no setup, sendo a proporção de células móveis do total; Motilidade Progressiva (%), refere-se à porcentagem de células movendo-se progressivamente; Velocidade de Trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$) é a velocidade média ininterrupta do trajeto da célula; Velocidade Progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$) é a velocidade média percorrida em linha reta, entre os pontos inicial e final do trajeto; Velocidade Curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$) é a velocidade média mensurada de ponto a ponto do trajeto percorrido pela célula.

Além disso, também são gerados outros dados, como a Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH, $\mu\text{m/s}$) é a largura média da oscilação da cabeça, conforme a célula se move; Frequência de Batimentos (BCF, Hz) é a frequência com que a cabeça do espermatozoide move-se para trás e para frente durante um trajeto percorrido; Retilinearidade (STR, %) é o valor médio da proporção entre VSL/VAP; Linearidade (LIN, %) é o valor médio da proporção entre VSL/VCL; e Velocidade Rápida (%) (MORTIMER, 2000; ARRUDA, 2011; AMANN e WABERSKI, 2014; BERGSTEIN, 2014).

3.5.2 Sondas fluorescentes

A funcionalidade de organelas dos espermatozoides, ou seus compartimentos, têm sido monitorados por procedimentos específicos de coloração, tecnicamente conhecidos como sondas fluorescentes. Estas sondas possuem a capacidade de se ligar a pontos específicos das células, diferindo assim dos corantes, e permitindo um diagnóstico mais fácil e direto, na dependência de suas características físicas (ARRUDA et al., 2011).

O uso de sondas fluorescentes em microscopia de epifluorescência, ou citometria de fluxo, permite avaliar a integridade das membranas plasmática e acrossomal, o potencial mitocondrial, a translocação de fosfolipídios de membrana, o índice de caspase-ativada, o índice de fragmentação de DNA, a integridade do flagelo, a peroxidação lipídica, a fosforilação da tirosina, a reação acrossômica, entre outros (ARRUDA et al., 2010; ARRUDA et al., 2011). Atualmente uma variedade muito grande de sondas fluorescentes tem sido utilizada, isoladamente ou em associações, pois a combinação de várias substâncias possibilita a avaliação de diversos compartimentos espermáticos, simultaneamente.

O diacetado de 6-carboxifluoresceína (DCF) é um corante penetrável à membrana plasmática do espermatozoide. Enzimas presentes no citoplasma espermático convertem a molécula de DCF em fluoresceína, que emite uma fluorescência verde. Haverá a conversão do DCF em fluoresceína somente se a membrana plasmática da célula espermática estiver íntegra, pois a membrana plasmática lesada não possibilita a permeabilidade a esse corante (HARRISON e VICKERS, 1990; ARRUDA et al., 2011).

O iodeto de propídio (IP) é uma sonda fluorescente também utilizada para avaliar a integridade da membrana plasmática, tem afinidade pelo DNA e cora em vermelho o núcleo da célula com membrana plasmática danificada (GRAHAM et al., 1990). O IP é impenetrável à membrana plasmática, porém, quando esta apresenta alguma falha de continuidade, a molécula de IP consegue penetrar na célula e se ligar ao DNA. Quando isso ocorre, é emitida uma fluorescência vermelha (CELEGHINI et al., 2007; 2008).

Ao se associar o DCF com o IP, é possível identificar três populações de espermatozoides. Os corados em verde não possuem a membrana plasmática lesada, por isso são considerados íntegros; os corados em vermelho são identificados como lesados, pois foi possível a penetração da sonda na célula e ligação ao DNA; e os lesados com acrossoma intacto

são corados em verde com o núcleo vermelho (HARRISON e VICKERS, 1990; ARRUDA et al., 2011).

A integridade do acrossoma pode ser verificada por diferentes técnicas de fluorescência. A mais aplicada é o uso de marcadores de glicoproteína, como lectinas (GRAHAM et al., 1990), entre eles, a aglutinina de *Pisum sativum* (PSA) tem sido amplamente utilizada (CROSS e MEIZEL, 1989), que é fluoresceína-conjugado com o isotiocianato de fluoresceína (FITC), e com isso marca os espermatozoides com acrossoma danificado em verde amarelo (CELEGHINI et al., 2007; 2010).

O iodeto de 5,5', 6,6' tetracoloro 1,1,3,3' tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) é um tipo especial de carbocianina, que tem sido usado com precisão como medida sensível para detectar alterações no potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides em várias espécies (DE ANDRADE et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2008; CELEGHINI et al., 2010). O JC-1 é capaz de detectar variações no potencial da membrana mitocondrial, por código de cor. Assim, a sonda muda reversivelmente do verde para o vermelho laranja à medida que a membrana mitocondrial se torna mais polarizada. A fluorescência verde do JC-1 existe como um monômero com baixo potencial de membrana, enquanto, o vermelho laranja em alto potencial de membrana do JC-1 é devido à formação de J-agregados (CELEGHINI et al., 2010).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-KHALEK, A. et al. Effect of Some Alternative Components of Egg Yolk in Tris-Extender on Sperm Characteristics of Ram Semen Frozen with Two Methods of Packaging Semen. **Journal of Animal and Poultry Production**, v. 9, n. 1, p. 33-40, 2018.

AIRES, V.A. et al. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. **Theriogenology**, v. 60, n. 2, p. 269-279, 2003.

AIS, E.G.; MEDINA, V.H.; VENTURINO, A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. **Theriogenology**, v. 57, p. 1801- 1808, 2002.

AITKEN, R.J. et al. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. **Molecular Human Reproduction**, v. 13, n. 4, p. 203-211, 2007.

AITKEN, R.J. Impact of oxidative stress on male and female germ cells: implications for fertility. **Reproduction**, v. 159, n. 4, p. R189-R201, 2020.

AKHTER, S. et al. Soya-lecithin in extender improves the freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 5, p. 815-819, 2012.

ALCAY, S. et al. Goat semen cryopreservation with rainbow trout seminal plasma supplemented lecithin-based extenders. **Andrologia**, v. 52, n. 4, p. e13555, 2020.

ALCAY, S. et al. Royal jelly supplemented soybean lecithin-based extenders improve post-thaw quality and incubation resilience of goat spermatozoa. **Cryobiology**, v. 74, p. 81-85, 2017.

ALVAREZ, C.A.; MORAES, G.V. Efeitos da Selenometionina e vitamina C sobre o sêmen. **Revista de Saúde e Biologia**, v.1, n. 1, p. 42-51, 2006.

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

AMANN, R.; WABERSKI, D., Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. **Theriogenology**, v. 81, p. 5-17, 2014.

AMMAN, R. P. **Cryopreservation of sperm**. In: Encyclopedia of Reproduction. v.1. (Eds E. Knobil and JD Neill.), p. 773–783, 1999.

ANSARI, M. S. et al. OPTIXcell improves the postthaw quality and fertility of buffalo bull sperm. **Theriogenology**, v. 85, n. 3, p. 528-532, 2016.

ANSARI, M. S. et al. OPTIXcell improves the postthaw quality and fertility of buffalo bull sperm. **Theriogenology**, v. 85, n. 3, p. 528-532, 2016.

ANZAR, Muhammad; RAJAPAKSHA, Kosala; BOSWALL, Lyle. Egg yolk-free cryopreservation of bull semen. **PLoS One**, v. 14, n. 10, p. e0223977, 2019.

ARANDO, A. et al. Storage temperature and sucrose concentrations affect ram sperm quality after vitrification. **Animal Reproduction Science**, v. 181, p. 175-185, 2017.

ARAÚJO SILVA, R.A.J. et al. Concentration of soybean lecithin affects short-term storage success of goat semen related with seminal plasma removal. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 4, p. 895-901, 2019.

ARIFANTINI, R.I.; YUSUF, T.L. Developing of tris soy milk diluent for Frisian Holstein bull frozen semen. **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 17, n. 2, p. 91-94, 2010.

ARRUDA, R. L. et al. Técnicas para avaliação laboratorial da integridade estrutural e funcional do sêmen congelado de touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 3, p. 168-184, 2010.

ARRUDA, R. P. et al. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 1, p. 8-16, 2007.

ARRUDA, R. P. et al. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 145-151, 2011.

AURICH, C.; SEEBER, P.; MÜLLER-SCHLÖSSER, F. Comparison of different extenders with defined protein composition for storage of stallion spermatozoa at 5 degrees C. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 42, p. 445-8, 2007.

BAKHACH, J. The cryopreservation of composite tissues: principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. **Organogenesis**, v. 5, n. 3, p. 119-126, 2009.

BANDAY, M.N. et al. Use of antioxidants reduce lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its cryopreservation. **Cryobiology**, v. 74, p. 25-30, 2017.

BANSAL, A.K.; BILASPURI, G.S. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, p. 1-7, 2011.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BATTELLIER, F. et al. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 181-190, 2001.

BERGERON, A. et al. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 1, p. 120-126, 2007.

BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular, Reproduction and Development**, v. 73, n. 10, p. 1338-1344, 2006.

BERGSTEIN, T. G.; WEISS, R. R.; BICUDO, S. D. Técnicas de análise de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 4, p. 189-194, 2014.

BEZERRA, F.S.B. Conservação do sêmen caprino sob refrigeração ou congelamento. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, Supl., p. S20-S25, 2010.

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, 2005.

BITTENCOURT, R.F. et al. Efeito de um quelante de cálcio, um detergente e da lecitina de soja sobre a qualidade do sêmen caprino congelado-descongelado. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 4, p. 305-312, 2008.

BOUSSEAU, S. et al. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. **Theriogenology**, v. 50, n. 5, p. 699-706, 1998.

CÂMARA, T. S. et al. Seminal extenders for small ruminants. **Ciência Animal**, v. 28, n. 2, p. 67-83, 2018.

CARVALHO, O.F.; FERREIRA, J.D.J.; SILVEIRA, N.A.; FRENEAU, G.E. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 1, p. 33-38, 2002.

CASTELO, T.Z.; FROTA, T.R.; SILVA, A.R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 2. n. 3, p. 67-75, 2008.

CASTRO, L. S. et al. Sperm cryodamage occurs after rapid freezing phase: flow cytometry approach and antioxidant enzymes activity at different stages of cryopreservation. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2016.

CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2013.

CELEGHINI, E. C. C. et al. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 5, p. 479-488, 2007.

CELEGHINI, E. C. C. et al. Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 3, p. 536-543, 2010

CELEGHINI, Eneiva Carla Carvalho et al. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v. 104, n. 2-4, p. 119-131, 2008.

CHAKRABARTY, J. et al. Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. **Cryobiology**, v. 54, p. 27-35, 2007.

CHUNMEI, X. et al. Effect of antioxidant supplementation on function and fertility of sex-sorted boar spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 136, p. 108-114, 2012.

CRESPILO, A. M. et al. Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or new lecithin based extenders. **Livestock Science**, v. 149, n. 1-2, p. 1-6, 2012.

CROSS, N.L.; MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. **Biology of Reproduction**, v. 41, n. 4, p. 635-641, 1989.

DA SILVA, F.E. et al. Effect of the addition of sodium caseinate on the viability of cryopreserved buffalo semen. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, n. 5supl1, p. 2209-2218, 2020.

DALMAZZO, A. **Utilização da lecitina de soja para a refrigeração e criopreservação do sêmen de cães**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

DE ANDRADE, A. F. C. et al. Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 2, p. 190-194, 2007.

DE MENEZES, E. B. et al. Milk proteins interact with goat Binder of SPerm (BSP) proteins and decrease their binding to sperm. **Cell and Tissue Research**, v. 366, n. 2, p. 427-442, 2016.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DINIZ, J.V.A. et al. Sodium caseinate improves longevity and fertility of frozen bull semen. **Theriogenology**, v. 154, p. 59-65, 2020.

DODARAN, H.V. et al. Effect of ethanol induced mild stress on post-thawed bull sperm quality. **Cryobiology**, v. 71, n. 1, p. 12-17, 2015.

DONNELLY, E.T. et al. Glutathione and hypotaurine in vitro: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. **Mutagenesis**, v. 15, n. 1, p. 61-68, 2000.

DORADO, J.; RODRÍGUEZ, I.; HIDALGO, M. Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. **Theriogenology**, v. 68, n. 2, p. 168-177, 2007.

EFRAIM, P.; ALVES, A.B.; JARDIM, D.C.P. Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 3, p. 181-201, 2011.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, J.S. Radicais livres: Conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FICKEL, J.; WAGENER, A.; LUDWIG, A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. **European Journal of Wildlife Research**, v. 53, n. 2, p. 81-89, 2007.

GADELLA, B.M. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 229-236, 2008.

GARCIA, M.A.; GRAHAM, E.F. Oialysis of bovine semen and it effect on fre h and freeze-thawed spermatozoa. **Cryobiology**, v. 24, p. 446-54, 1987.

GARNER, D.L. et al. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 57, n. 6, p. 1401-1406, 1997.

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, Sally E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Reproduction**, v. 88, n. 1, p. 343-352, 1990.

HE, L.; BAILEY, J. L.; BUHR, M. M. Incorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potential. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 1, p. 69-79, 2001.

HEZAVEHEI, M. et al. Sperm cryopreservation: a review on current molecular cryobiology and advanced approaches. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 37, n. 3, p. 327-339, 2018.

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

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000b.

ISMAIL, A.A. et al. Effects of mint, thyme, and curcumin extract nanoformulations on the sperm quality, apoptosis, chromatin decondensation, enzyme activity, and oxidative status of cryopreserved goat semen. **Cryobiology**, 2020.

JAHANBIN, R. et al. In Vivo and In Vitro Evaluation of Bull Semen Processed with Zinc (Zn) Nanoparticles. **Biological Trace Element Research**, p. 1-10, 2021.

JEYENDRAN, R.S. et al. Cryopreservation of human sperm in a lecithin-supplemented freezing medium. **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 4, p. 1263-1265, 2008.

KLINC, P.; FRESE, D.; OSMERS, H.; RATH, D. Insemination with sex sorted fresh bovine spermatozoa processed in the presence of antioxidative substances. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 1, p. 58-62, 2007.

KLINC, P.; RATH, D. Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 1, p. 63-67, 2007.

LAGARES, M.A. et al. Caseinate protects stallion sperm during semen cooling and freezing. **CryoLetters**, v. 33, n. 3, p. 213-218, 2012.

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

LI, F.; GONG, Q.; DONG, H.; SHI, J. Resveratrol, a neuroprotective supplement for alzheimer's disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, p. 27-33, 2012.

LI, Y. **Antioxidants in biology and medicine: essentials, advances, and clinical applications**. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2011, 422 p.

LU, J. C.; HUANG, Y. F.; LÜ, N. Q. Computer-aided sperm analysis: past, present and future. **Andrologia**, v. 46, n. 4, p. 329-338, 2014.

LUKUSA, K. et al. Semen collection methods and cooling rates affect post-thaw sperm motility and kinematic parameters of Saanen goat. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 9, n. 5, p. 239, 2020.

LUNA-OROZCO, J.R. et al. Comparison of different diluents based on liposomes and egg yolk for ram semen cooling and cryopreservation. **Iranian journal of veterinary research**, v. 20, n. 2, p. 126, 2019.

LUSIGNAN, M.F. et al. The major proteins of bovine seminal plasma interact with caseins and whey proteins of milk extender. **Biology of Reproduction**, v. 85, n. 3, p. 457-464, 2011.

MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A. A. Inseminação artificial em caprinos no Brasil: estágio atual. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 19, n. 1-2, p. 61-72, 1995.

MAIA, M. da S.; BICUDO, S. D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2009.

MAIA, M.S. et al. Efeito da adição de lauril sulfato de sódio (OEP) ao diluidor na viabilidade do sêmen congelado de ovinos Santa Inês. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 3, p. 521-530, 2008.

MANEESH, M.; JAYALEKSHMI, H. Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 21, n. 2, p. 80-89, 2006.

MANJUNATH, P. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 4, p. 809-815, 2012.

MARCHESI, D.E.; FENG, H.L. Sperm DNA integrity from sperm to egg. **Journal of Andrology**, v. 28, n. 4, p. 481-489, 2007.

MAZZI, L. et al. Quercetin and rutin: effects of two flavonoids on induced oxidative stress in human ejaculated sperm. **Journal of the Siena Academy of Sciences, Published Since**, v. 3, p. 22-26, 2011.

MEDRANO, A.; HOLT, W. V.; WATSON, P. F. Controlled freezing studies on boar sperm cryopreservation. **Andrologia**, v. 41, n. 4, p. 246-250, 2009.

MORTIMER, S.T. CASA - practical aspects. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 4, p. 515-524, 2000.

MORTIMER, S.T.; MAXWELL, W.M.C. Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 11, p. 25-30, 1999.

MORTIMER, S.T.; VAN DER HORST, G.; MORTIMER, D. The future of computer-aided sperm analysis. **Asian Journal of Andrology**, v. 17, n. 4, p. 545, 2015.

NAJAFI, A. et al. Ethylene glycol, but not DMSO, could replace glycerol inclusion in soybean lecithin-based extenders in ram sperm cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 177, p. 35–41, 2017.

NASCIMENTO, J. et al. Effects of sperm concentration and straw volume on motion characteristics and plasma, acrosomal, and mitochondrial membranes of equine cryopreserved spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, n. 6, p. 351-358, 2008.

OLIVEIRA, I.R.S. de et al. Correlações entre o teste hiposmótico e a avaliação clássica do sêmen de caprinos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 2, p. 216-221, 2013.

ORTEGA, A.M. et al. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. **Interciencia**, v. 28, p. 699-704, 2003.

PAPA, F.O. et al. Replacing egg yolk with soybean lecithin in the cryopreservation of stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v. 129, n. 1-2, p. 73-77, 2011.

PEREIRA, P. C. Milk nutritional composition and its role in human health. **Nutrition**, v. 30, p. 619-627, 2014.

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

PLANTE, G. et al. Evolution and function of mammalian binder of sperm proteins. **Cell and Tissue Research**, v. 363, n. 1, p. 105-127, 2016.

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

PURDY, P.H. et al. Effects of the flavonoids, silibinin and catechin, on the motility of extended cooled caprine sperm. **Small Ruminant Research**, v. 55, p. 239-243, 2004.

RANA, A.P. et al. Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1061, p. 185-196, 1991.

RANA, A.P. et al. Phospholipid asymmetry of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1210, p. 1-7, 1993.

RANAWAT, P.; KAUSHIK, G.; SAIKIA, U.N.; PATHAK, C.M.; KHANDUJA, K.L. Quercetin impairs the reproductive potential of male mice. **Andrologia**, v. 45, n. 1, p. 56-65, 2013.

REVELL S.G, MRODE R.A. An osmotic resistance test for bovine semen. **Animal Reproduction Science**, v.36, p.77-86. 1994.

ROOF, D.J. et al. Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. **Theriogenology**, v. 77, p. 412-420, 2012.

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

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, v. 38, p. 1-36, 1995.

SALEH, R.A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 6, p. 737-752, 2002.

SALMANI, H. et al. In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. **Cryobiology**, v. 68, p. 276-280, 2014.

SANOCA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.2, p.12-18, 2004.

SEIFI-JAMADI, Afshin et al. Antioxidant effect of quercetin in an extender containing DMA or glycerol on freezing capacity of goat semen. **Cryobiology**, v. 75, p. 15-20, 2017.

SIKKA, S.C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 1, p. 5-18, 2004.

SILVA, E.C.B.; GUERRA, M.M.P. Terapias antioxidantes na criopreservação espermática. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 111, n. 583-584, p. 143-149, 2012.

SILVA, N.N. et al. Micelas de caseína: dos monômeros à estrutura supramolecular. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, 2019.

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.

STORNELLI, M.C. et al. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. **Analecta Veterinaria**, v. 25, n. 2, p. 28-35, 2005.

TAKAHASHI, K.; UCHIDA, A.; KITAO, M. Hypoosmotic swelling test of sperm. **Archives of andrology**, v. 25, n. 3, p. 225-242, 1990.

TONIOLLI, R.; CANTANHÊDE, L.F. Aspectos gerais da criopreservação de sêmen suíno. **Ciência Animal**, p. 45-62, 2019.

TRALDI, A.S. Biotécnicas aplicadas em reprodução de pequenos ruminantes. **III Feinco**, 2006.

TURRENS, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **Journal of Physiology**, v. 552, n. 2, p. 335-344, 2003.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VERSTEGEN, J.P.; ONCLIN, K.; IGUER-OUADA, M. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: in vitro and in vivo studies. **Theriogenology**, v. 64, p. 720-733, 2005.

VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2003.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, n. 4, p. 871-891, 1995.

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

WILHELM, K. M.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Effects of phosphatidylserine and cholesterol liposomes on the viability, motility, and acrosomal integrity of stallion spermatozoa prior to and after cryopreservation. **Cryobiology**, v. 33, n. 3, p. 320-329, 1996.

YESTE, M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. **Theriogenology**, v. 85, n. 1, p. 47-64, 2016.

ZERON, Y. et al. The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. **Cryobiology**, v. 45, n. 2, p. 143-152, 2002.

5 ARTIGO CIENTIFICO

5.1 Diluidor quimicamente definido à base de Tris-caseína na congelação de sêmen caprino

Chemically defined dilutor based on Tris-casein in freezing goat semen

Souza, J.H.¹; Monteiro, M.M.¹; Seal, D.C.M.¹; Trevisan, M.¹; Arruda, L.C.P.¹; Guerra, M.M.P.^{1*}

¹Laboratório de andrologia (ANDROLAB), Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife, Pernambuco, Brasil

***Autor para correspondência:** Maria Madalena Pessoa Guerra, Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE. CEP: 52171-900. Brasil. Tel: +55 81 3320 6412. E-mail: mmpguerra@gmail.com

RESUMO

Os diluidores de sêmen à base de leite ou gema de ovo não apresentam padronização em sua composição, o que pode causar uma variabilidade nos resultados obtidos, além de poderem causar contaminação por microrganismos. Portanto, estudos acerca de diluidores contendo apenas componentes químicos com efeitos protetores aos espermatozoides são de grande importância. Com isso, objetivou-se elaborar um diluidor quimicamente definido, à base de Tris-caseína, para avaliar seu efeito e eficácia no processo de congelamento de sêmen caprino. Para tanto, foram utilizados três bodes em idade reprodutiva e as colheitas de sêmen foram realizadas pelo método de vagina artificial e uma fêmea como manequim. Foram colhidos oito ejaculados por macho, totalizando 24 amostras de sêmen. Após a colheita, os ejaculados com motilidade superior a 70% foram agrupados em *pools* seminais. Para congelamento, foi utilizado diluidor convencional, constituindo o grupo controle (Tris-gema de ovo), assim como diluidor à base de Tris-caseína, em diferentes concentrações (**CAS1**: 0,125g/L; **CAS2**: 0,25g/L; **CAS3**: 0,5g/L), acrescidos com 5% de glicerol. Após diluição (200×10^6 espermatozoides/mL), as palhetas (0,25 mL) identificadas foram congeladas em sistema automatizado e armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C). Após descongelamento (37 °C, 30 s), as amostras foram submetidas às análises de cinética (CASA), integridade de membrana plasmática, integridade do acrossoma e potencial de membrana mitocondrial (microscópio de epifluorescência). Os parâmetros cinéticos não evidenciaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos, com exceção da frequência de batimento flagelar (BCF), onde o grupo CAS3 apresentou valor superior ($P \leq 0,05$) ao do grupo controle. Quanto às análises de integridade de membrana plasmática, integridade do acrossoma e potencial de membrana mitocondrial, não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os grupos avaliados. Conclui-se que o diluidor quimicamente definido à base de Tris suplementado com caseína (0,125g/L, 0,25g/L e 0,5g/L) apresenta-se como uma alternativa viável ao diluente convencional (Tris-gema de ovo), utilizado para congelamento de sêmen caprino.

Palavras-chave: congelamento, crioprotetor, gema de ovo, caseína.

ABSTRACT

Semen extenders based on milk or egg yolk do not have a standardized composition, which can cause variability in the results obtained, in addition for being biological material, it is able to cause contamination of semen by microorganisms. Therefore, studies on extenders containing only chemical components with protective effects on sperm are necessary. The objective of the present work was to elaborate a chemically defined extender, based on Tris-casein, and to evaluate its effect and efficacy in the goat semen freezing process. For this purpose, three goats of reproductive age were used and semen collections were obtained by the artificial vagina method and one female as dummy. Eight ejaculates were collected per male, totaling 24 ejaculates. After semen collection, the ejaculates that presented motility greater than 70% were grouped in seminal pools. For freezing, a conventional extender was used, constituting the control group (Tris-egg yolk), as well as a extender based on Tris-casein, in different concentrations (CAS1: 0.125g / L; CAS2: 0.25g / L; CAS3: 0.5g / L), added with 5% of glycerol. After dilution (200×10^6 sperm / mL), straws (0.25 mL) were identified and frozen in an automated system and stored in liquid nitrogen (-196°C). After thawing (37°C , 30 s), the samples were submitted to kinetic analysis (CASA), plasma membrane integrity, acrosome integrity and mitochondrial membrane potential. The kinetic parameters did not present significant difference ($P > 0.05$), with an exception of the flagellar beat frequency (BCF), where the CAS3 group had a higher value ($P \leq 0.05$) than the control group. As for the analysis of plasma membrane integrity, acrosome integrity and mitochondrial membrane potential analysis, there were no significant difference ($P > 0.05$) between the groups evaluated. It can be concluded that the chemically defined extender based on Tris-casein presents as a viable alternative to the conventional diluent based on Tris-egg yolk, used for freezing goat semen.

Keywords: Casein, Crioprotectant, Egg Yolk, Freezing.

1 Introdução

A criopreservação de sêmen é uma ferramenta importante para a conservação dos recursos genéticos. Entretanto, a conservação dos espermatozoides pelo frio pode provocar danos às células espermáticas, particularmente durante a congelação, por determinar alterações espermáticas letais ou subletais em níveis ultraestrutural, bioquímico e funcional, que resultam na redução de motilidade, viabilidade e capacidade fertilizante dos espermatozoides (ALCAY et al., 2020).

Um dos pontos primordiais para o sucesso da criopreservação está relacionado ao meio diluidor. Em termos gerais, um bom diluidor deve ter em sua composição carboidratos, como fonte de energia; tampões para manutenção do pH e da osmolaridade; antibióticos para inibir o crescimento microbiano; crioprotetores não penetrantes que, além de terem função nutritiva, protegem as células contra o choque frio, à medida que são refrigeradas até 5 °C; e crioprotetores penetrantes para protegerem os espermatozoides dos efeitos deletérios da congelação (PURDY, 2006; CASTELO et al., 2008).

Os diluidores mais utilizados para a criopreservação de sêmen são baseados em produtos de origem animal, como gema de ovo ou leite. Preocupações foram levantadas nos últimos anos sobre o seu potencial risco como veículos para patógenos causadores de doenças e sua segurança sanitária (BOUSSEAU et al., 1998; CHELUCCI, 2015; ANSARI et al., 2016). Além disso, a qualidade do sêmen pós-descongelação também pode ser influenciada por diferenças individuais da qualidade inerente à gema do ovo, devido ao número de dias após a postura, ao período de armazenamento e à diferença entre a alimentação das aves (DEL VALLE, 2013; ANZAR, 2019).

A fim de solucionar os entraves acima descritos e permitir o processamento mais adequado e seguro do sêmen, algumas alternativas para a substituição do leite desnatado e da gema de ovo têm sido relatadas, dentre as quais se pode destacar a lecitina de soja (ALCAY et al., 2017; MEHDIPOUR et al., 2017; NAJAFI et al., 2017; ARAÚJO SILVA et al., 2019), caseinato (DA SILVA et al., 2020) e lipoproteínas de baixa densidade (LUNA-OROZCO et al., 2019). Diluidores à base destes componentes têm demonstrado efeito protetor sobre as células

espermáticas, fato que os torna importantes alternativas para a formulação de diluidores seminais (ALCAY et al., 2017; ARAÚJO SILVA et al., 2019; DA SILVA et al., 2020).

Entre os componentes citados, a caseína tem demonstrado efeito positivo no processo de criopreservação espermática. Sendo o principal componente proteico, a caseína representa 75-80% de todas as proteínas do leite (BATTELIER, 2001; PEREIRA, 2014), com capacidade de estabilizar as membranas espermáticas, evitando a perda de fosfolipídios, uma vez que competem diretamente com proteínas plasmáticas seminais, responsáveis pela desestabilização da membrana (BERGERON e MANJUNATH, 2006; BERGERON et al., 2007).

Além disso, as micelas de caseína possuem propriedade de interagir com íons de cálcio. Estes íons são responsáveis por induzir a fosforilação da tirosina para iniciar o processo de capacitação, bem como melhorar a taxa de ligação do espermatozoide à zona pelúcida de oócitos, com consequente aumento da produção de embriões *in vitro* (DA SILVA et al., 2020; DINIZ et al., 2020).

Dessa forma, a caseína tem sido responsável pela proteção dos espermatozoides, mesmo em baixas concentrações no sêmen refrigerado (0,6%) ou congelado (1,35%) (LAGARES et al., 2012). Porém, são necessários estudos sobre sua utilização no processo de congelamento do sêmen caprino, visando avaliar seu efeito e eficácia sobre as células espermáticas.

Por conseguinte, o objetivo deste estudo foi elaborar um diluidor quimicamente definido à base de caseína para congelamento de sêmen caprino, a fim de permitir adequada conservação espermática, com eliminação dos riscos e das barreiras sanitárias oriundos do uso de diluidores convencionais.

2 Material e Métodos

Exceto quando especificado, todos os reagentes usados no experimento foram obtidos da Sigma-Aldrich Company (St Louis, MO, EUA).

Foram utilizados três bodes da raça Saanen, sexualmente maduros, com histórico de fertilidade e individualmente alojados, pertencentes ao Departamento de Zootecnia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, Brasil (8° 03'14" S e 34° 52'52" W). Os animais foram alimentados com 400g/animal/dia de concentrado comercial, assim como feno de Tifton, água e sal mineral *ad libitum*. O protocolo experimental foi aprovado pelo

Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (URFPE- Brasil), sob o processo nº 051/2019/CEUA.

Os ejaculados foram obtidos pelo método da vagina artificial, usando uma fêmea como manequim. Oito ejaculados foram colhidos por macho, perfazendo duas coletas por semana e um total de 24 ejaculados. Após a colheita, os ejaculados foram imediatamente submetidos à análise macroscópica (volume, cor, aspecto e odor) e microscópica (turbilhonamento, motilidade e vigor) em microscópio de contraste de fase (Olympus, Japão; 100x). Os ejaculados que apresentaram valores mínimos de 70% de motilidade total foram aprovados e destinados à formação do *pool*. Em seguida, a concentração espermática do *pool* foi determinada, utilizando a câmara de Neubauer, e a motilidade foi analisada pelo sistema computadorizado de análise espermática (CASA, SCATM; Microptics, S.L., Versão 5.1. Barcelona, Espanha). O *pool* de sêmen foi submetido duas vezes ao processo de lavagem em Tampão TRIS (3,605 g Tris; 2,024 g ácido cítrico; 1,488 g frutose, 100 mL de água MilliQ, pH 6,8), por meio de centrifugação (600 g/10 min), para a remoção do plasma seminal. Após tal procedimento, foram utilizados os *pools* que tinham valores mínimos de 70% de motilidade total.

Uma amostra de sêmen foi diluída em meio de congelação à base de Tris-gema de ovo (Tris 375 mM, ácido cítrico 124 mM, frutose 41,6 mM, gema de ovo 20%, penicilina 100 UI, estreptomicina 50 mg, glicerol 5%, pH 7,2), constituindo o grupo controle (GC). As demais amostras foram diluídas em meio quimicamente definido à base de Tris (Tris 375 mM, ácido cítrico 124 mM, frutose 41,6 mM, L-carnitina 2 mM, piruvato de sódio 1mM, penicilina 100 UI, estreptomicina 50 mg, glicerol 5%, pH 7,2), acrescido de caseína em diferentes concentrações, constituindo os grupos experimentais (CAS1 = 0,125g/L; CAS2 = 0,25g/L; CAS3 = 0,5g/L).

Todos os grupos tiveram a concentração padronizada para 200×10^6 espermatozoides/mL. Em seguida, as amostras foram armazenadas em palhetas (0,25 mL) e congeladas em sistema automatizado (TK-3000®, TK Tecnologia em congelação Ltda., Uberaba, Brasil), utilizando a curva de refrigeração específica para sêmen caprino, com redução de temperatura de 0,25 °C/min até atingir 5 °C, onde permaneceram por 120 min para a estabilização. A curva negativa foi iniciada com redução de 20 °C/min, até atingir -120 °C, quando as palhetas foram imersas e armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C).

Após um intervalo mínimo de 24h de armazenamento em nitrogênio líquido, duas palhetas por grupo experimental foram descongeladas (37 °C por 30s). Para a avaliação da cinética espermática, através do sistema computadorizado (CASA), alíquotas (10 µL) de sêmen foram diluídas em Tris, obtendo a concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL, e incubadas em banho-maria (37 °C/5 min). Em seguida, uma alíquota (2,5 µL) da amostra diluída foi colocada sobre a lâmina e coberta com lamínula (18 x 18 mm), ambas pré-aquecidas (37 °C), avaliadas em microscópio de contraste de fase (Eclipse 50i, Nikon, Japão, 100x). As imagens foram capturadas por uma câmera de vídeo (Basler Vision Technologies TM A312FC, Alemanha). Em cada amostra, cinco campos aleatórios foram selecionados, com registro de, no mínimo, 500 células espermáticas.

Os parâmetros cinéticos avaliados utilizando o software SCA™, versão 5.1 (Microptics, S.L., Barcelona, Espanha), foram: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade rápida (RAP, %) linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %), índice de oscilação (WOB, %); velocidade curvilínea (VCL, µm/s), velocidade em linha reta (VSL, µm/s), velocidade média da trajetória (VAP, µm/s), deslocamento lateral da cabeça (ALH, µm/s) e frequência de batimento cruzado (BCF, Hz). Os valores do sistema CASA foram mensurados com as seguintes configurações: temperatura 37 °C; magnificação, 100x; número de imagens, 25; imagens por segundo, 25; área da cabeça, 20 a 70 µm²; VAP: lentos 10 µ/s < médios 45 µ/s < rápidos 75µ/s; progressividade, 80% STR; circular, 50% LIN.

A avaliação da integridade da membrana plasmática (iMP) foi determinada pelo método de dupla coloração, utilizando a combinação de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA; 0,46 mg/mL em DMSO) e iodeto de propídio (PI; 0,5 mg/mL em PBS), conforme descrito por Araújo silva et al. (2019). Para cada grupo, uma alíquota da amostra (30 µL) foi corada com 5,0 µL de CFDA e 5,0 µL de PI e incubada por 10 min (25 °C). Usando excitação DBP 485/20 nm e filtros de emissão DBP 580-630 nm, 200 células foram avaliadas por lâmina em um microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) com uma ampliação de 400x. Os espermatozoides corados apenas em verde foram considerados como portadores de membranas intactas e aqueles corados em vermelho como portadores de membranas danificadas.

A integridade de acrossoma (iAC) foi avaliada usando o corante isotiocianato de fluoresceína conjugado com Aglutinina de Amendoim (FITC-PNA; 100 µg/mL em PBS) (ARAÚJO SILVA et al., 2019). Alíquotas (10 µL) da amostra foram usadas para fazer um

esfregaço, o qual foi seco ao ar, corado com 30 μ L de FITC-PNA e incubado em câmara úmida (4 °C por 15 minutos), no escuro. Em seguida, as lâminas foram imersas em PBS duas vezes e secas ao ar naturalmente. Imediatamente antes da avaliação, 5,0 μ L da solução (4,5 mL de glicerol, 0,5 mL de PBS e 5,0 mg de p-fenilenodiamina) foram colocados na lâmina e cobertos com uma lamínula. Um total de 200 espermatozoides por lâmina foram avaliados usando excitação BP 450–490 nm e filtros de emissão LP 515 nm, com uma ampliação de 400x. Os espermatozoides corados em verde fluorescente na região do acrossoma foram classificados como portadores de acrossomas intactos, enquanto que aqueles corados em verde fluorescente apenas na região equatorial da cabeça espermática, ou não se apresentaram corados, foram classificados como portadores de acrossomas danificados.

O potencial de membrana mitocondrial (aPMM) foi avaliado usando o fluorocromo catiônico lipofílico (JC-1; 0,15 mM em DMSO) (ARAÚJO SILVA et al., 2019). Alíquotas de 30 μ L da amostra foram coradas com 5,0 μ L de JC-1 e incubada por 10 min (25 °C). 200 espermatozoides foram avaliados usando excitação BP 450–490 nm e filtros de emissão LP 515 nm, em uma ampliação de 400x. Os espermatozoides que apresentaram peça intermediária corada em laranja foram classificados como portadores de alto potencial de membrana mitocondrial, enquanto os espermatozoides corados em verde na peça intermediária foram classificados como portadores de baixo potencial de membrana mitocondrial.

Para análise estatística, os grupos experimentais foram testados para a normalidade usando o Teste Shapiro-Wilk. Em seguida, as variáveis normalmente distribuídas foram analisadas com Análise de Variância (ANOVA) unilateral, seguida do teste de Tukey. Os não normalmente distribuídos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis. Os dados foram expressos como média $\pm$ SD (desvio padrão) e foram considerados significativos se $P < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se a versão GraphPad Prism8 (Version 8.0.1).

3 Resultados

Os resultados da análise de cinética espermática estão apresentados na Tabela 1. Observa-se que nos parâmetros de MT, MP, VAP, VSL, VCL, ALH, STR, LIN, RAP e WOB não foram evidenciadas diferenças ($P>0,05$) entre o grupo controle (Tris-gema de ovo) e os demais grupos congelados em meio quimicamente definido à base de Tris, acrescidos de diferentes concentrações de caseína (CAS1, CAS2 e CAS3). No entanto, houve aumento significativo ($P<0,05$) na frequência de batimento cruzado (BCF) dos espermatozoides, ao utilizar o diluidor quimicamente definido à base de Tris-caseína, na concentração de 0,5g/L (CAS3), quando comparado ao grupo controle (Tris-gema de ovo).

Em relação aos parâmetros de integridade de membrana plasmática (iMP), integridade de acrossoma (iAC) e potencial de membrana mitocondrial (PMM) apresentados na Tabela 2, não se observou diferença significativa ($P>0,05$) nos valores desses parâmetros ($P>0,05$) nos diferentes grupos congelados com diluidor quimicamente definido à base de Tris, adicionado de caseína em diferentes concentrações (CAS1, CAS2 e CAS3), quando comparados ao grupo controle (Tris-gema de ovo).

Tabela 1. Cinemática (CASA) de espermatozoides caprinos congelados em diluidor Tris-Gema de ovo ou quimicamente definido à base de Tris, adicionado de diferentes concentrações de caseína (CAS1 = 0,125g/L; CAS2 = 0,25g/L; CAS3 = 0,5g/L). Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	CONTROLE	CAS1	CAS2	CAS3
MT (%)	50.43 $\pm$ 12.89	36.11 $\pm$ 12.07	31.39 $\pm$ 11.17	33.09 $\pm$ 16.09
MP (%)	27.99 $\pm$ 8.51	19.06 $\pm$ 8.92	16.97 $\pm$ 6.79	18.54 $\pm$ 9.32
RAP (%)	10.96 $\pm$ 5.30	9.29 $\pm$ 5.77	6.21 $\pm$ 3.56	9.58 $\pm$ 5.45
LIN (%)	73.70 $\pm$ 13.96	67.56 $\pm$ 8.04	73.70 $\pm$ 4.01	66.47 $\pm$ 10.44
STR (%)	86.97 $\pm$ 7.83	86.59 $\pm$ 4.85	87.90 $\pm$ 2.21	87.80 $\pm$ 3.96
WOB (%)	87.03 $\pm$ 9.73	77.80 $\pm$ 5.84	83.39 $\pm$ 3.20	79.79 $\pm$ 4.90
VCL (μ m/s)	66.26 $\pm$ 9.20	67.93 $\pm$ 12.25	61.30 $\pm$ 7.69	67.89 $\pm$ 10.36
VSL (μ m/s)	47.97 $\pm$ 6.76	45.96 $\pm$ 10.14	46.28 $\pm$ 4.85	47.51 $\pm$ 7.83
VAP (μ m/s)	55.11 $\pm$ 5.09	52.77 $\pm$ 9.74	51.01 $\pm$ 5.95	54.01 $\pm$ 7.96
ALH (μ m)	1.90 $\pm$ 0.57	2.41 $\pm$ 0.43	2.03 $\pm$ 0.31	2.35 $\pm$ 0.55
BCF (Hz)	9.41 $\pm$ 2.17 ^b	11.74 $\pm$ 1.38 ^{ab}	10.44 $\pm$ 1.39 ^{ab}	12.97 $\pm$ 1.07 ^a

MT = Motilidade total; MP = motilidade progressiva; RAP = motilidade rápida; LIN = linearidade; STR = retilinearidade; WOB = índice de oscilação; VCL = velocidade curvilínea; VSL = velocidade em linha reta; VAP = velocidade média da trajetória; ALH = deslocamento lateral da cabeça, BCF = frequência de batimento cruzado. ^{a,b} letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística entre os tratamentos (P<0,05).

Tabela 2. Percentual de espermatozoides caprinos portadores de membrana plasmática e acrossoma íntegros, alto potencial de membrana mitocondrial, após congelação em diluidor à base de Tris-Gema de ovo (Controle) ou quimicamente definido à base de Tris-caseína em diferentes concentrações (CAS1 = 0,125g/L; CAS2 = 0,25g/L; CAS3 = 0,5g/L). Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle	CAS1	CAS2	CAS3
iMP (%)	38.07 $\pm$ 11.05	34.49 $\pm$ 9.45	23.57 $\pm$ 15.68	31.57 $\pm$ 12.54
iAC (%)	20.28 $\pm$ 5.23	25.14 $\pm$ 23.13	29.67 $\pm$ 10.51	22.42 $\pm$ 7.68
aPMM (%)	42.50 $\pm$ 17.49	45.07 $\pm$ 25.13	34.79 $\pm$ 26.63	21.50 $\pm$ 20.33

iMP – integridade de membrana plasmática; iAC – integridade de acrossoma; aPMM – alto potencial de membrana mitocondrial.

4 Discussão

Este estudo foi realizado visando elaborar e avaliar um diluidor à base de Tris-caseína obtida do leite bovino, a fim de permitir adequada conservação de espermatozoides caprinos, com eliminação dos riscos biológicos e das barreiras sanitárias oriundos do uso de diluidores convencionais (leite desnatado ou Tris-gema). Os resultados obtidos demonstram que os diluidores à base de Tris-caseína podem ser usados para congelação de sêmen caprino, visto que, não apresentaram diferença significativa quanto ao padrão de movimento e a cinética espermática quando comparados ao grupo controle. Exceto, o grupo experimental contendo Tris-caseína na concentração de 0,5g/L (CAS3), o qual apresentou aumento significativo apenas no parâmetro de frequência dos batimentos flagelar (BCF) em relação ao grupo controle.

Dessa forma, é evidente a capacidade de proteção das células espermáticas após o processo de congelação utilizando diluidor à base de Tris, adicionado de caseína nas diferentes concentrações (CAS1 = 0,125g/L; CAS2 = 0,25g/L; CAS3 = 0,5g/L). O mecanismo de proteção da caseína sobre os gametas não está totalmente elucidado, mas, como foi verificado por alguns autores, acredita-se que as proteínas do leite protejam os espermatozoides por meio da interação com as proteínas BSP, evitando perda de lipídios pela membrana espermática, o que pode ser prejudicial ao armazenamento dos espermatozoides, semelhante à proteção já conhecida do diluidor à base de Tris-gema de ovo (BERGERON e MANJUNATH, 2006; IGBOKWE et al., 2019) e utilizada neste estudo como grupo controle. Entretanto, neste estudo, o sêmen foi centrifugado, removido o plasma seminal e, conseqüentemente, as proteínas BSP antes da congelação do sêmen. Dessa forma, é improvável que o mecanismo pelo qual as caseínas protejam os gametas envolva somente uma interação direta com as proteínas do plasma seminal.

Segundo Coutinho da Silva et al. (2012) e Diniz et al. (2020), embora o mecanismo não tenha sido totalmente elucidado, a caseína pode aumentar a capacitação espermática devido a um aumento no cálcio intracelular. Além disso, as caseínas podem interagir com o glicocálice espermático, de maneira que possam expor mais facilmente os receptores de espermatozoide/oócito ou aumentar a sensibilidade dessas proteínas ao oócito e dessa forma, aumentar a ligação dos espermatozoides a zona pelúcida (ZP) do oócito, o que é desejável para se obter boa fertilização.

Entre os diluentes à base da proteína do leite, melhores resultados vêm sendo demonstrados com a caseína. Em um experimento com suínos, a caseína reduziu os danos gerados pela criopreservação, retendo colesterol, reduzindo a atividade das caspases e mantendo a integridade do DNA (COUTINHO DA SILVA et al., 2012). Também em trabalhos de fertilização in vitro, a suplementação do meio diluidor para criopreservação do sêmen com caseína elevou a taxa de clivagem embrionária (TATEMOTO et al., 2015).

Ressalta-se, entretanto, que na análise da cinética espermática das amostras submetidas à congelação/descongelação observou-se que a frequência dos batimentos da cauda (BCF) dos espermatozoides diluídos em Tris-caseína na concentração de 0,5g/L (CAS3) foi maior do que aquela observada nos gametas do grupo controle, constituído de Tris-gema de ovo. Este resultado pode ser favorável à fertilização, uma vez que a migração e a penetração do espermatozoide no muco cervical são favorecidas por elevados valores de BCF e LIN (MORTIMER, 2000). Além disso, segundo Dorado et al. (2010), os resultados do CASA podem ser utilizados como indicadores de fertilidade do sêmen caprino pós-congelação, uma vez que valores médios de BCF foram significativamente maiores em amostras de sêmen que obtiveram gestação bem sucedida, quando comparados àquelas que não alcançaram esse resultado após a IA. Da mesma forma, este parâmetro (BCF), juntamente com ALH, LIN, VAP e VSL, foi associado com sêmen de alta fertilidade em touros (FARRELL et al., 1998). Em ovinos também foi demonstrado que o VAP, VCL e BCF possuem alta correlação com a fertilidade espermática, pós-congelação (DEL OLMO et al., 2013). Por conseguinte, há fortes evidências de que o sêmen diluído em Tris-caseína, na concentração de 0,5g/L, tenha maiores taxas de fertilidade, quando comparado ao sêmen congelado em diluidor à base de Tris-gema de ovo (grupo controle). No entanto, estudos são necessários

O sucesso no processo de congelação do sêmen também pode ser avaliado pela quantidade de espermatozoides mantidos íntegros após descongelação, demonstrando a proteção exercida pelo diluente sobre a estrutura da membrana plasmática (BERGERON et al., 2007; MAZIERO et al., 2009). Assim, a integridade da membrana espermática é um requisito necessário para a sobrevivência espermática pós-descongelação (WATSON et al., 2000). No presente estudo, a integridade da membrana plasmática foi avaliada utilizando as sondas fluorescentes, onde não se verificou diferença significativa entre o grupo Tris-gema de ovo (controle) e os grupos Tris-caseína (CAS1 = 0,125g/L; CAS2 = 0,25g/L; CAS3 = 0,5g/L).

A análise de integridade do acrossoma também não evidenciou diferença nos resultados obtidos entre os diferentes grupos congelados em diluidor à base de Tris-gema de ovo (controle) ou em Tris-caseína (CAS1 = 0,125g/L; CAS2 = 0,25g/L; CAS3 = 0,5g/L). Estes resultados demonstraram que o diluidor quimicamente definido à base de caseína pode exercer função protetora à membrana espermática e ao acrossoma, da mesma forma que o diluidor convencional à base de Tris-gema de ovo.

Em relação ao potencial de membrana mitocondrial, sua associação com a fertilidade é incerta. No entanto, na maioria das espécies, o uso de sondas fluorescentes para avaliação do potencial mitocondrial é muito utilizado, visto que há alta afinidade deste potencial com a capacidade energética e motilidade celular (VISHWANATH e SHANNON, 2000; ROY e ATREJA, 2008). Nesse estudo, também não se observou diferença significativa no percentual de espermatozoides portadores de alto potencial de membrana mitocondrial do grupo controle (Tris-gema de ovo) ou dos grupos congelados em diluidor quimicamente definido à base de Tris-caseína (CAS1 = 0,125g/L; CAS2 = 0,25g/L; CAS3 = 0,5g/L).

Portanto, ao se avaliar os resultados apresentados nesse trabalho, comprova-se que a substituição da gema de ovo por caseína, na composição do diluidor de congelamento de sêmen caprino, não causa redução na qualidade de cinética, integridade da membrana plasmática, integridade do acrossoma e potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides submetidos à congelamento e descongelamento. Sendo assim, estes resultados estão de acordo com dados anteriores obtidos com sêmen bovino (BATTELIÉ et al., 2001; DINIZ et al., 2020), equino (MARTINS et al., 2016; CAMPOS et al., 2018) e ovino (SALGADO et al., 2020), demonstrando que a caseína pode ser tão efetiva na preservação dos parâmetros de fertilidade de espermatozoides congelados quanto os diluidores convencionais que possuem gema de ovo em sua composição.

Com base no exposto, conclui-se que o diluidor quimicamente definido à base de Tris suplementado com caseína (0,125g/L, 0,25g/L e 0,5g/L) apresenta-se como uma alternativa viável ao diluente convencional (Tris-gema de ovo) utilizado para congelamento do sêmen caprino.

Declaração de interesses dos autores

Não há interesses concorrentes que tenham sido declarados.

Fonte de financiamento

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001; pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento científico e Tecnológico (CNPq); pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE); e pela Agencia Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES, pela concessão de bolsa de mestrado, e ao CNPq, FACEPE e FINEP, pelo auxílio financeiro e aquisição de equipamentos. Ao Departamento de Zootecnia da UFRPE, pela disponibilização dos animais.

5 Referências

- ALCAY, S. et al. Goat semen cryopreservation with rainbow trout seminal plasma supplemented lecithin-based extenders. **Andrologia**, v. 52, n. 4, p. e13555, 2020.
- ALCAY, Selim et al. Royal jelly supplemented soybean lecithin-based extenders improve post-thaw quality and incubation resilience of goat spermatozoa. **Cryobiology**, v. 74, p. 81-85, 2017.
- ANZAR, Muhammad; RAJAPAKSHA, Kosala; BOSWALL, Lyle. Egg yolk-free cryopreservation of bull semen. **Plos One**, v. 14, n. 10, p. e0223977, 2019.
- ARANDO, A. et al. Storage temperature and sucrose concentrations affect ram sperm quality after vitrification. **Animal Reproduction Science**, v. 181, p. 175-185, 2017.
- ARAÚJO SILVA, R.A.J. et al. Concentration of soybean lecithin affects short-term storage success of goat semen related with seminal plasma removal. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 4, p. 895-901, 2019.
- BATTELIER, F. et al. Advances in cooled sêmen technology. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 181-190, 2001.
- BATTUT, B. et al. Prediction of the fertility of stallion frozen-thawed sêmen using a combination of computer-assisted motility analysis, microscopical observation and flow cytometry. **Theriogenology**, v. 97, p. 186-200, 2017.
- BERGERON, A. et al. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 1, p. 120-126, 2007.
- BERGERON, A. et al. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 1, p. 120-126, 2007.
- BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, n. 10, p. 1338-1344, 2006.
- BOUSSEAU, S. et al. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. **Theriogenology**, v. 50, n. 5, p. 699-706, 1998.

BRINSKO, S.P.; CROCKETTM, E.C.; SQUIRES, E.L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. **Theriogenology**, v. 54, p. 129-136, 2000.

CAMPOS, G.A. Comparação entre diluentes a base de leite desnatado e caseinato de sódio na refrigeração do sêmen equino. 2018.

CASTELO, T.Z.; FROTA, T.R.; SILVA, A.R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 2. n. 3, p. 67-75, 2008.

CASTRO, L. S. et al. Sperm cryodamage occurs after rapid freezing phase: flow cytometry approach and antioxidant enzymes activity at different stages of cryopreservation. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2016.

CHANG-HE, L. et al. Effects of pH during liquid storage of goat semen on sperm viability and fertilizing potential. **Animal Reproduction Science**, v. 164, p. 47-56, 2016.

CHELUCCI, S. et al. Soybean lecithin-based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 83, n. 6, p. 1064-1074, 2015.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3a ed. Belo Horizonte: **CBRA**, 2013.

COUTINHO DA SILVA, Marco A. et al. Effects of components of semen extenders on the binding of stallion spermatozoa to bovine or equine zonae pellucidae. **Reproduction**, v. 143, n. 5, p. 577-585, 2012.

DA SILVA, F.E. et al. Effect of the addition of sodium caseinate on the viability of cryopreserved buffalo semen. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, n. 5supl1, p. 2209-2218, 2020.

DE MENEZES, E. B. et al. Milk proteins interact with goat Binder of Sperm (BSP) proteins and decrease their binding to sperm. **Cell and Tissue Research**, v. 366, n. 2, p. 427-442, 2016.

DEL OLMO, E. et al. Fertility of cryopreserved ovine semen is determined by sperm velocity. **Animal Reproduction Science**, v. 138, n. 1-2, p. 102-109, 2013.

DEL VALLE, I. et al. Soy lecithin interferes with mitochondrial function in frozen-thawed ram spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 4, p. 717-725, 2012.

DINIZ, J.V.A. et al. Sodium caseinate improves longevity and fertility of frozen bull semen. **Theriogenology**, v. 154, p. 59-65, 2020.

DORADO, J.; MUNOZ-SERRANO, A.; HIDALGO, M. The effect of cryopreservation on goat semen characteristics related to sperm freezability. **Animal Reproduction Science**, v. 121, n. 1-2, p. 115-123, 2010.

FARRELL, P. B. et al. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology**, v. 49, n. 4, p. 871-879, 1998.

IGBOKWE, A. A. et al. Comparative effect of slow and rapid freezing on sperm functional attributes and oxidative stress parameters of goat spermatozoa cryopreserved with tiger nut milk extender. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 3, p. 551-559, 2019.

KOTHARI, Shiva et al. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. 2010.

LAGARES, M. A. et al. Caseinate protects stallion sperm during semen cooling and freezing. **CryoLetters**, v. 33, n. 3, p. 213-218, 2012.

LOVE, C.C. et al. Effect of daily semen centrifugation and resuspension on the longevity of equine sperm quality following cooled storage. **Theriogenology**, v. 77, p. 1911-1917, 2015.

LUNA-OROZCO, J.R. et al. Comparison of different diluents based on liposomes and egg yolk for ram semen cooling and cryopreservation. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 20, n. 2, p. 126, 2019.

LUSIGNAN, M.F. et al. The major proteins of bovine seminal plasma interact with caseins and whey proteins of milk extender. **Biology of Reproduction**, v. 85, n. 3, p. 457-464, 2011.

MARTINS, M.I.M.; SOUZA, F.F.; SOUZA, A.K.; MOROTTI, F. Methods and advances in semen analysis. **Biotechnology of Animal Reproduction**, v. 97, p. 105 – 134, 2016.

MAZIERO, R.R. D. et al. Análise de sêmen bovino e sua relação com a fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, p. 5-10, 2009.

MEHDIPOUR, M. et al. Effect of lecithin nanoliposome or soybean lecithin supplemented by pomegranate extract on post-thaw flow cytometric, microscopic and oxidative parameters in ram semen. **Cryobiology**, v. 78, p. 34-40, 2017.

MORTIMER, S.T. CASA—practical aspects. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 4, p. 515-524, 2000.

MURPHY, E. M. et al. A comparison of semen diluents on the in vitro and in vivo fertility of liquid bull sêmen. **Journal Dairy Science**, v. 100, p. 1541–1554, 2017.

NAJAFI, A. et al. Ethylene glycol, but not DMSO, could replace glycerol inclusion in soybean lecithin-based extenders in ram sperm cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 177, p. 35–41, 2017.

OLIVEIRA, I.R.S. et al. Correlações entre o teste hiposmótico e a avaliação clássica do sêmen de caprinos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 2, p. 216-221, 2013.

PARINAUD, J. et al. Enhancement of motility by treating spermatozoa with an antioxidant solution (Sperm-Fit©) following ejaculation. **Human Reproduction**, v. 12, p. 243 - 246, 1997.

PEREIRA, P. C. Milk nutritional composition and its role in human health. **Nutrition**, v. 30, p. 619-627, 2014.

PLANTE, G. et al. Evolution and function of mammalian binder of sperm proteins. **Cell and Tissue Research**, v. 363, n. 1, p. 105-127, 2016.

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

ROY, S. C.; ATREJA, S. K. Effect of reactive oxygen species on capacitation and associated protein tyrosine phosphorylation in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 1-2, p. 68-84, 2008.

SALGADO, L.C. Utilização do caseinato de sódio na congelação de sêmen ovino. 2020.

STORNELLI, M.C. et al., Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. **Analecta Veterinaria**, v. 25, n. 2, p. 28-35, 2005.

SUNDARARAMAN, M.; KALATHARAN, J.; JAWAHAR, K.T.P. Computer assisted sêmen analysis for quantification of motion characteristics of bull sperm during cryopreservation cycle. **Vet World**, v. 5, p. 723-726, 2012.

TATEMOTO, Hideki et al. Addition of Casein to the Diluents during Semen Transportation Improves the Post-Thaw Qualities of Okinawan Native Agu Pig Spermatozoa. **Nihon Danchi Chikusan Gakkaihou**, v. 58, n. 1, p. 75-86, 2015.

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