

JERÔNIMO HUGO DE SOUZA

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

**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 DE 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 DE 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 a 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*, 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 e a querer sempre ser 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!

À toda minha família, pelo o 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 o 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 dessa grande equipe que constitui o laboratório de andrologia (ANDROLAB).

À 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.

À 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 flagelar
HOST	Teste hiposmótico
RNS	Espécies reativas ao 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 ao oxigênio
STR	Retilinearidade

VAP	Velocidade média da trajetória
VCL	Velocidade curvilínea
VSL	Velocidade em linha reta
WOB	Índice de oscilação (VAP/VCL)

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 da sua capacidade contaminante e da disseminação de microrganismos patógenos. Diluidores contendo apenas componentes químicos, conhecidos em concentração, 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 congelamento 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 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 e funcionalidade da membrana plasmática, integridade do acrossoma e 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 e funcionalidade 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-caseína pode ser utilizado para congelamento de sêmen caprino, em virtude de preservar os parâmetros cinéticos, a integridade e funcionalidade da célula, semelhantes àqueles obtidos com diluidor convencional à base de gema de ovo.

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), 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.....	11
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3.1 Particularidades da criopreservação de sêmen.....	14
3.2 Danos espermáticos causados no processo de congelamento/descongelamento.....	15
3.3 Diluidores.....	16
3.4 Diluidores quimicamente definidos.....	18
3.4.1 Caseína.....	19
3.5 Análise espermática.....	20
3.5.1 Sistema Computadorizado (CASA).....	20
3.5.2 Teste hiposmótico (HOST).....	22
3.5.3 Sondas fluorescentes.....	22
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 disseminação de material genético, particularmente no caso de raças ameaçadas de extinção (ARANDO et al., 2017). 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 do rebanho (CASTRO et al., 2016).

Entretanto, a conservação dos espermatozoides pelo frio torna-se 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 criopreservação de 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 tem 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).

Diluidores à base destes componentes têm demonstrado efeitos protetores 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). A caseína é o principal componente proteico e representa 75-80% de todas as proteínas do leite (BATTELIER, 2001), tem a capacidade de estabilizar as membranas espermáticas, evitando a perda de fosfolípidios, uma vez que competem diretamente com as proteínas plasmáticas seminais, responsáveis pela desestabilização da membrana (BERGERON e MANJUNATH, 2006; BERGERON et al., 2007). Responsável pela proteção dos gametas, 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 congelação de sêmen de reprodutores caprinos.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Elaborar 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);
- ✓ Verificar a eficácia do diluidor quimicamente definido à base de Tris-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 com diluidor convencional (tris-gema de ovo) ou quimicamente definido à base de Tris-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 pode ser fator limitante para a reprodução de alguns animais (CASTELO et al., 2008; LUNA-OROZCO et al., 2019).

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.

Já 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).

No entanto, 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/dcongelação

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 morfológicamente 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 congelamento, 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 congelamento 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).

Enquanto na descongelamento, caracterizada por mudanças inversas às ocorridas no processo de congelamento, 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 descongelamento, 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 descongelamento 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 descongelamento 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 catabólicos no plasma seminal, os quais são extremamente prejudiciais à célula (CASTELO, 2008). Portanto, é essencial que o sêmen seja diluído adequadamente para que haja um número suficiente de espermatozoides para acomodar as células em palhetas de inseminação, 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).

Portanto, 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).

Desse modo, 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 à base de 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 disso, 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 aumentando os 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 tem sido amplamente estudados e desenvolvidos como alternativas para a substituição dos componentes convencionais, com 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).

A lecitina de soja (LS) possui um elevado conteúdo de lipoproteína de baixa densidade e, portanto, tem se mostrado uma alternativa viável à 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; ARIFANTINI 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).

Outas 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).

Já a micela de caseína isolada pode proteger os espermatozoides de garanhões, bodes, carneiros e touros durante armazenamento a 4 – 5 °C, além de proteger os espermatozoides de touros, na presença de glicerol, durante o processo de congelação. 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* (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 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 Curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$) é a velocidade média mensurada de ponto a ponto do trajeto percorrido pela célula; 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 Teste hiposmótico (HOST)

As membranas biológicas são as responsáveis pela homeostase celular, por meio de suas trocas com o meio externo. Uma das propriedades da membrana celular é a habilidade de permitir o transporte seletivo de moléculas, principalmente aquelas com baixo peso molecular (TAKAHASHI et al., 1990; REVELL e MRODE, 1994; ARRUDA et al., 2011).

Sabendo-se que a membrana plasmática está envolvida em trocas metabólicas com o meio, o estudo de sua funcionalidade torna-se essencial, haja vista a grande influência de sua

atividade bioquímica nos processos de capacitação espermática e fertilização, e, quando realizado juntos aos parâmetros tradicionais de avaliação do sêmen, resulta em determinação mais precisa dos índices de fertilidade (OLIVEIRA et al., 2013).

Quando colocado em uma solução hiposmótica, a água entra no espermatozoide na tentativa de alcançar o equilíbrio osmótico. O influxo de água irá aumentar o volume espermático e provocar edema da membrana plasmática, com conseqüente turgidez e redução da razão volume/superfície. O flagelo do espermatozoide, por apresentar uma membrana mais frágil do que aquela presente na região da cabeça, parece ser suscetível ao teste. A capacidade do flagelo de se dobrar na presença de uma solução hiposmótica indica que o transporte de água através da membrana ocorre normalmente e que esta estrutura celular se encontra íntegra e funcional (BITTENCOURT, 2005; ARRUDA et al., 2011).

3.5.3 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 fosfolípidios 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 um corante 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 no 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' tetracloro 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 uma sonda fluorescente capaz de detectar variações no potencial da membrana mitocondrial, por código de cor. Assim, o corante 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.; BILASPURIG.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.

BATTELIER, F. et al. Advances in cooled sêmen 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.

CRESPILHO, 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. 5sup11, 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 its effect on fresh 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.

SANOCKA, 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*}

Andrology Laboratory (ANDROLAB), Department Veterinary Medicine, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife, Pernambuco, Brazil

***Corresponding author:** 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, e 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 foram realizadas pelo método de vagina artificial e uma fêmea como manequim. Foram colhidos 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 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 descongelação (37 °C, 30 s), as amostras foram submetidas às análises de cinética (CASA), integridade e funcionalidade da membrana plasmática, integridade do acrossoma e 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 e funcionalidade 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-caseína apresenta-se como uma alternativa viável ao diluente convencional à base de Tris-gema de ovo, utilizado para congelação do sêmen caprino.

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 (200x10⁶ 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.

1 Introdução

A criopreservação de sêmen é uma ferramenta importante para a conservação dos recursos genéticos. Entretanto, a conservação dos espermatozoides pelo frio torna-se um problema, particularmente durante a congelação, por determinar 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).

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 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 microbiológica (BOUSSEAU et al., 1998; CHELUCCI, 2015; ANSARI et al., 2016). Além disso, a qualidade do sêmen pós-descongelado 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 às diferenças entre produtores (DEL VALLE, 2013; ANZAR, 2019).

A fim de solucionar estes entraves 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 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).

A caseína é a principal proteína do leite e representa 75-80% de todas as proteínas encontradas neste produto (PEREIRA, 2014). Esta proteína tem a capacidade de estabilizar as membranas espermáticas, evitando a perda de fosfolípidios, uma vez que competem diretamente com proteínas plasmáticas seminais, responsáveis pela desestabilização da membrana (BERGERON e MANJUNATH, 2006; BERGERON et al., 2007). Assim, a caseína é responsável pela proteção dos espermatozoides, mesmo em baixas concentrações no sêmen refrigerado (0,6%) ou congelado (1,35%) (LAGARES et al., 2012). Porém, é necessário estudos sobre sua utilização no processo de congelação do sêmen caprino, visando avaliar seu efeito e eficácia sobre as células espermáticas.

Por conseguinte, o objetivo principal deste estudo foi elaborar um diluidor quimicamente definido à base de caseína, para congelação do 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 sais minerais *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 de vagina artificial, usando uma fêmea como manequim. Oito ejaculados foram colhidos por macho (duas coletas por semana), para 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 espermática 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 remoção do plasma seminal. Após processamento, 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 tratados (CAS1 = 0,125g/L; CAS2 = 0,25g/L; CAS3 = 0,5g/L). Após diluição, todos os grupos apresentaram concentração final de 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

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 avaliação da cinética espermática, alíquotas (10µL) de sêmen foram diluídas em Tris, para a concentração de 50×10^6 spz/mL, e incubadas em banho-maria (37 °C/5 min). Para análise no sistema computadorizado (CASA), uma alíquota (3µL) da amostra diluída foi colocada sobre a lâmina e coberta com lamínula (18 x 18 mm), ambas pré-aquecidas (37 °C) e 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). Para cada amostra, cinco campos aleatórios foram selecionados, com registro de, no mínimo, 500 células espermáticas. As variáveis analisadas 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 batimentos (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.

As análises espermáticas realizadas em microscopia de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) com uma ampliação de 400 ×, usando um filtro de emissão DBP 580–630 nm e um filtro de excitação DBP 485–520 nm, seguiram metodologia descrita por ARAÚJO SILVA et al. (2019). A integridade da membrana plasmática (iMPA) foi avaliada 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). Para cada tratamento, 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). Duzentos espermatozoides foram avaliados usando DBP 485/20 nm de excitação e DBP 580-630 nm filtros de emissão, 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). Para cada tratamento, uma alíquota (10 µL) da amostra foi usada para fazer um esfregaço, o qual foi seco ao ar, corado com 30 µL 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 µL 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. Duzentos espermatozoides 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 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 alto potencial de membrana mitocondrial (aPMM) foi avaliado usando um fluorocromo catiônico lipofílico (JC-1; 0,15 mM em DMSO). Para cada tratamento, uma alíquota de 30 µL da amostra foi corada com 5,0 µL de JC-1 e incubada por 10 min (25 °C). Duzentos 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.

Visando avaliar a integridade funcional da membrana plasmática foi feito o teste hiposmótico. Para tal, uma solução à base de citrato de sódio (50%) e frutose (50%) a 100 mOsm/L foi preparada de acordo com OLIVEIRA et al. (2013). Para análise, uma palheta de cada grupo experimental foi descongelada (37 °C por 30s) e colocados 10 µL de sêmen em um eppendorf contendo 100 µL da solução hiposmótica. Após 30 minutos de incubação em banho-maria (37 °C), uma alíquota de cada grupo foi avaliada sob microscopia de contraste de

fase (Olympus, Japão; 1000x), sendo contadas 200 células. Os espermatozoides apresentando cauda dobrada e edemaciada foram considerados como portadores de membrana plasmática funcional. O resultado foi expresso em porcentagem, após a diferença entre a porcentagem de espermatozoides reativos e não reativos ao HOST.

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 ($P < 0,05$) na frequência de batimento flagelar (BCF) 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), potencial de membrana mitocondrial (aPMM) e teste hiposmótico (HOST) apresentados na Tabela 2, não se observou aumento ($P > 0,05$) nos valores desses parâmetros ($P > 0,05$) nos diferentes grupos congelados com diluidor quimicamente definido à

base de Tris-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-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.

	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 batimentos. ^{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 e teste hiposmótico, após congelamento 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.

	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
HOST (%)	60.71 \pm 10.40	46.86 \pm 22.07	56.26 \pm 15.18	48.79 \pm 18.81

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

4 Discussão

Os diluidores tradicionais para congelação de 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 (BOUSSEAU et al., 1998; PURDY, 2006; CHELUCCI, 2015). Em virtude disso, as demandas de substituição destes componentes por substâncias capazes de conferir crioproteção aos espermatozoides aumentaram nos últimos anos. Sendo assim, a caseína, principal proteína do leite, está sendo investigada como sendo o componente do leite responsável por proteger os espermatozoides contra as injúrias resultantes da baixa temperatura de criopreservação (BERGERON e MANJUNATH, 2006; BERGERON et al., 2007; MANJUNATH et al., 2012). Destaca-se que este é o primeiro artigo a fornecer evidências de que o diluidor quimicamente definido suplementado com caseína pode ser utilizado para congelação de sêmen caprino.

A motilidade espermática vem sendo utilizada como critério primário para avaliar a qualidade do sêmen por diversos autores. Uma vez que os espermatozoides precisam ser transportados para o oviduto para encontrarem e penetrarem o ovócito, porcentagem elevada de espermatozoides móveis pode indicar boa capacidade fertilizante do sêmen (SUNDARARAMAN et al., 2012; LOVE et al., 2015; BATTUT et al., 2017). O Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal (CBRA, 2013) recomenda uma motilidade mínima de 30% e 50×10^6 espermatozoides/dose para sêmen caprino pós-congelação. Ressalta-se então que, apesar dos valores absolutos de MT e MP apresentarem-se numericamente inferiores nos grupos diluídos em Tris-caseína, não se obteve nenhuma diferença significativa entre todos os grupos avaliados. Por conseguinte, é importante destacar que os resultados de qualquer diluidor utilizado no presente trabalho (Tris-gema de ovo ou Tris-caseína nas concentrações de 0,125g/L, 0,25g/L ou 0,5g/L) ultrapassam a motilidade mínima (30%) recomendada pelo CBRA, evidenciando a possibilidade da utilização do diluidor à base de Tris-caseína para congelação de sêmen caprino.

Além disso, neste estudo, o padrão de movimento e a cinética espermática (MT, MP, RAP, LIN, STR, WOB, VCL, VSL, VAP e ALH) dos grupos diluídos em Tris-caseína (CAS1 = 0,125g/L; CAS2 = 0,25g/L; CAS3 = 0,5g/L) não diferiram do grupo controle (Tris-gema de ovo). Estes dados evidenciam a capacidade de proteção da caseína, nas diferentes concentrações utilizadas, contra as crioinjúrias causadas durante o processo de congelação, semelhante à proteção já conhecida do diluidor à base de Tris-gema de ovo (controle). Esses achados são consistentes com os resultados de estudos anteriores, onde se acredita que as proteínas do leite tenham interação com as proteínas BSP (CHANG-HE LIU et al., 2016; IGBOKWE et al., 2019). As BSP são proteínas de ligação à fosfolipina, altamente conservadas em mamíferos, que se associam às membranas espermáticas. Essas moléculas têm efeitos prejudiciais na preservação de espermatozoides bovinos (BERGERON et al., 2007; MENEZES et al., 2016; DINIZ et al., 2020), mas também se ligam a caseínas e proteínas do soro do leite. Esse tipo de interação protege os espermatozoides durante o armazenamento (BERGERON et al., 2007; LUSIGNAN et al., 2011; MENEZES et al., 2016). Está bem estabelecido que, quando altas concentrações de BSPs livres estão em contato com os espermatozoides, elas extraem lipídios das membranas (BERGERON e MANJUNATH 2006; IGBOKWE et al., 2019). Desta forma, a exposição contínua às BSPs causa uma extensa perda de lipídios das membranas espermáticas, o que pode ser prejudicial ao armazenamento dos espermatozoides (BERGERON e MANJUNATH, 2006; BERGERON et al., 2007). Assim, a interação das proteínas BSP com as micelas de caseína pode diminuir a quantidade de proteínas BSP livres, limitar a perda lipídica das membranas espermáticas e, portanto, proteger os espermatozoides durante o armazenamento (PLANTE et al., 2015; MENEZES et al., 2016), o que explicaria a proteção dos espermatozoides observada neste estudo.

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 no 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, foram associados 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 do sêmen 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).

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 e funcionalidade da membrana plasmática foram avaliadas utilizando as sondas fluorescentes e o teste hiposmótico, 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 evidenciam 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 (ROY e ATREJA, 2008; VISHWANATH e SHANNON, 2000). 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 congelação de sêmen, não causa redução na qualidade de cinética, integridade e funcionalidade da membrana plasmática, integridade do acrossoma e potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides caprinos submetidos à congelação e descongelação. Sendo assim, estes resultados estão de acordo com dados anteriores obtidos com sêmen bovino (BATTELIER et al., 2001; DINIZ et al., 2020) e equino (MARTINS et al., 2016; CAMPOS et al., 2018) e ovinos (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 compostos por gema de ovo.

Com base no exposto, conclui-se que o diluidor quimicamente definido à base de Tris-caseína apresenta-se como uma alternativa viável ao diluente convencional à base de Tris-gema de ovo utilizado para congelação 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.

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. **Anim Reprod Sci**, 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.; 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.
- 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.

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.

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.

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. **Biotech of Ani Reprod**, v. 97, p. 105 – 134, 2016.

MAZIERO, R.R. D. et al. Análise de sêmen bovino e sua relação com a fertilidade. **R. bras. Reprod. Anim.**, 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. **J Dairy Sci**, 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. **Hum Reprod**, 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.

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.

