



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

SUPLEMENTAÇÃO DE CASEÍNA AO DILUIDOR CONVENCIONAL OU
QUIMICAMENTE DEFINIDO PARA REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO

MARIANA TREVISAN

RECIFE – PE

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

SUPLEMENTAÇÃO DE CASEÍNA AO DILUIDOR CONVENCIONAL OU
QUIMICAMENTE DEFINIDO PARA REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO

MARIANA TREVISAN

Dissertação submetida à Coordenação do curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

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

RECIFE – PE

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

T814s

Trevisan, Mariana

SUPLEMENTAÇÃO DE CASEÍNA AO DILUIDOR CONVENCIONAL OU
QUIMICAMENTE DEFINIDO PARA REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO / Mariana
Trevisan. - 2020.

61 f. : il.

Orientadora: Profa Dra Maria Madalena Pessoa Guerra.

Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal Tropical, Recife, 2020.

1. Caseína. 2. Criopreservação. 3. Diluidor. I. Guerra, Maria Madalena Pessoa, orient. II.

Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal Tropical, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às normas de ética científica.

**SUPLEMENTAÇÃO DE CASEÍNA AO DILUIDOR CONVENCIONAL OU
QUIMICAMENTE DEFINIDO PARA REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO**

MARIANA TREVISAN
Dissertação aprovada em 20 de fevereiro de 2020

Prof^a. Dr^a. Maria Madalena Pessoa Guerra (DMV/UFRPE)
Orientadora

Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro (DMV/UFRPE)
Membro Titular

Prof^a. Dr^a. Sildivane Valcácia Silva (CBiotec/UFPB)
Membro Titular

Prof^a. Dr^a. Andreia Fernandes de Souza (DZ/UFRPE)
Membro Suplente

Dr^a. Lúcia Cristina Pereira Arruda (DMV/UFRPE)
Membro Suplente

**Dedico esta dissertação,
Aos maiores merecedores dessa conquista, meu pai e minha mãe,
Ao grande amor da minha vida, para sempre meu neném, Mônica,
Ao meu companheiro de jornada, Gleidson.**

“São as nossas escolhas que definem quem realmente somos, muito mais do que nossas qualidades.”

J.K. Rowling

“Honestidade nunca é demais. Sua moral não se ganha, se faz!”

Racionais mc

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço àqueles sem os quais eu nada seria, minha família. Ao meu pai, que desde que nasci viveu sua vida em função de suas filhas. À minha mãe, que sempre abriu mão do que era necessário, para nossa felicidade. Aos meus avós, sempre presentes, preocupados e carinhosos. À minha irmã Mônica, que nunca vai deixar de ser meu bem mais precioso e sempre me apoia à sua maneira. À mais nova integrante, que é tão criativa e comunicativa, minha sobrinha Daniela.

Aos meus amigos, que continuam em minha vida, aqueles que surgiram, aqueles que verdadeiramente importam e se preocupam.

Ao meu amor, que suportou todas as insanidades causadas nesse período, o responsável por aliviar o estresse e cansaço, quem me apoiou em todo o processo, Gleidson.

A todos do AndroLab pelo apoio, ensinamento e amizade. Especialmente as pessoas mais aleatórias que poderiam surgir nesse processo, Millena, Desireé e Jerônimo, sem vocês esse tempo não teria sido tão divertido.

À Prof^a Madalena Guerra (orientadora) pela oportunidade e confiança em todo processo, experimentos, escrita e sabatinas.

À banca, pela leitura detalhada, sugestões e correções, obrigada pela dedicação a melhorar esse trabalho.

APOIO FINANCEIRO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES;

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;

Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco – FACEPE;

Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP.

SUMÁRIO

Página

DEDICATÓRIA	
AGRADECIMENTOS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Criopreservação de curta duração.....	17
2.2 Particularidades do sêmen durante a criopreservação.....	18
2.3 Danos causados no processo de criopreservação.....	19
2.4 Diluidores.....	20
2.4.1 Leite.....	22
2.5 Diluidor quimicamente definido.....	22
2.5.1 Caseína.....	23
2.6 Análises do sêmen.....	25
2.6.1 Sistema de análise espermática assistida por computador.....	26
2.6.2 Citometria de fluxo.....	27
-Integridade de membrana plasmática e acrossomal.....	28
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
4 ARTIGO.....	39

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquemática das micelas de caseína proposta originalmente por De Kruif e Holt, 2013.....	24
Figura 2. Integridade de membrana plasmática e acrossomal de espermatozoides caprinos, submetidos a refrigeração (5 °C) em diferentes diluidores, avaliados nos tempos 0h, 24h, 48h e 72h, por citometria de fluxo; Dados expressos como média e desvio-padrão. A) Experimento I – Leite desnatado (LD); Leite desnatado suplementado com 0.25g/L de caseína (LC0.25); Leite desnatado suplementado com 0.5g/L de caseína (LC0.5); B) Experimento II – Leite desnatado (LD) ou diluidor quimicamente definido (QD).....	61

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Valores de probabilidade para os efeitos da caseína em diferentes concentrações (0, 0.25 ou 0.50g/L; Experimento I), adicionada ao diluidor à base de leite desnatado, do tempo (0, 24, 48 e 72 horas) e suas interações nos parâmetros das análises da cinética (CASA) e da integridade de membrana plasmática e acrossomal (citometria de fluxo) de espermatozoides caprinos, pós-refrigeração.	57
Tabela 2. Parâmetros cinéticos (CASA) de espermatozoides caprinos refrigerados em diluidor à base de leite desnatado, suplementado ou não com caseína (Experimento I). Dados demonstrados como média e desvio padrão.....	58
Tabela 3. Valores de probabilidade para os efeitos do diluidor à base de leite desnatado ou quimicamente definido (Experimento II), do tempo (0, 24, 48 e 72 horas) e suas interações nos parâmetros das análises da cinética (CASA) e da integridade de membrana plasmática e acrossomal (citometria de fluxo) de espermatozoides caprinos, pós-refrigeração.	59
Tabela 4. Parâmetros cinéticos (CASA) de espermatozoides caprinos refrigerados em diluidor à base de leite desnatado ou quimicamente definido (Experimento II). Dados demonstrados como média e desvio padrão.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

IA- Inseminação Artificial

CASA- Sistema de Análise Espermática Computadorizada

PBS- Fosfato Salino Tamponado

iPMA- integridade das membranas plasmática e acrossomal

PNA-*Peanut agglutinin*

DMSO- dimetilsulfóxido

IP- iodeto de propídio

LIN - linearidade

MP- motilidade progressiva

MT – motilidade total

ROS – espécies reativas ao oxigênio

STR - retilinearidade

VAP – velocidade média da trajetória

VCL - velocidade curvilínea

VSL – velocidade em linha reta

DNA – ácido desoxirribonucleico

pH – potencial hidrogeniônico

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 consistem em uma variedade de substâncias, não sendo possível conhecer a sua exata composição, além da sua capacidade contaminante e da disseminação de microrganismos patogênicos. Diluidores contendo apenas componentes químicos, conhecidos em concentração, com efeitos protetores dos espermatozoides seriam, portanto, uma vantagem. Com isso, objetivou-se avaliar os efeitos da adição de caseína ao diluidor de refrigeração de sêmen caprino e a produção de novo diluidor, tendo como principal agente crioprotetor, não-penetrante, a caseína. Para coleta de sêmen foram utilizados três bodes, sexualmente maduros, e as colheitas de sêmen foram realizadas pelo método de vagina artificial, e uma fêmea como manequim. O sêmen foi diluído (200×10^6 espermatozoide/mL), de acordo com os experimentos. Exp. I - diluidor à base de leite desnatado (LD), adicionado ou não de diferentes concentrações de caseína (0.25g/L e 0.5g/L); Exp. II - diluidor à base de leite desnatado ou diluidor quimicamente definido (QD) à base de caseína (0.5g/L). Imediatamente após a diluição, as amostras foram armazenadas em geladeira (5 °C) e analisadas após estabilização (0h) e após 24, 48 e 72 horas de armazenamento, quanto à cinética espermática (CASA) e integridade de membrana plasmática e acrossomal (citometria de fluxo). No Exp. I, observou-se que a adição de caseína não teve efeito sobre os parâmetros cinéticos, mas, após 24h, o diluidor suplementado com caseína na concentração de 0.25g/L apresentou maior percentual de gametas com integridade de membrana plasmática e acrossomal ($p=0.013$), quando comparado ao diluidor sem adição de caseína. No Exp. II – Os parâmetros cinéticos analisados pelo CASA não apresentaram diferença significativa, com exceção da LIN (linearidade), onde, no tempo de 72h, o leite teve melhor desempenho do que o QD ($p=0.016$). Na integridade de membrana plasmática e acrossomal observou-se efeito fixo de tratamento ($p=0.008$), onde o diluidor de leite determinou maior percentual de gametas com integridade na membrana plasmática e acrossomal do que o QD. Também houve interação tratamento \times tempo, no tempo 48h ($p=0.007$) e no tempo 72h ($p=0.018$), com diluidor à base de leite desnatado apresentando melhor desempenho. Conclui-se que a adição de caseína a 0.25g/L, como suplementação ao diluente à base de leite desnatado, preserva a integridade da membrana plasmática e acrossomal de espermatozoides caprinos, submetidos a 24 horas de refrigeração. Além disso, em virtude do diluidor quimicamente definido preservar a cinética de espermatozoides caprinos, após 48 horas de refrigeração, e a integridade de membrana plasmática e acrossomal, até 24 horas de refrigeração, é possível sugerir a realização de mais estudos visando ampliar os benefícios da utilização deste diluidor, em substituição ao diluidor convencional à base de leite desnatado para refrigeração de sêmen caprino.

Palavras-chave: Criopreservação, crioprotetor, leite desnatado, diluidor, caseína.

ABSTRACT

Conventional semen extenders - based on milk or egg yolk - present problems because they are biological products that consist of a variety of substances, and it is not possible to know their exact composition, in addition to their contaminating capacity and the spread of pathogenic microorganisms. Extenders containing only chemical components, known in concentration, with protective effects of sperm would therefore be an advantage. Thus, the objective was to evaluate the effects of adding casein to the goat semen cooling extender and the production of a new extender with casein as the main non-penetrating cryoprotective agent. To collect semen, three goats were used, sexually mature, semen collections were performed by the artificial vagina method, with the help of a female as a mannequin. The semen was diluted (200×10^6 sperm / mL) according to the experiments. Exp. **I** – extender based on skim milk (LD), supplemented or not with different concentrations of casein (0.25g / L and 0.5g / L); Exp. **II** – extender based on skim milk or chemically defined extender (QD) based on casein (0.5g / L). Immediately after dilution, the samples were stored in a refrigerator (5 ° C) and analyzed after stabilization (0h) and after 24, 48 and 72 hours of storage, for sperm kinetics (CASA) and plasma and acrosomal membrane integrity (cytometry flow). In Exp. **I**, it was observed that the addition of casein had no effect on the kinetic parameters, but after 24h the extender supplemented with casein at a concentration of 0.25g/L showed greater integrity of the plasma and acrosomal membrane ($p=0.013$), when compared to the extender without the addition of casein. In Exp. **II**, the kinetic parameters analyzed by CASA showed no significant difference, except for LIN (linearity), where in 72h the skim milk extender performed better than the QD ($p=0.016$). In the integrity of the plasma and acrosomal membrane, a fixed treatment effect was observed ($p=0.008$), where the skim milk extender determined greater integrity in the plasma and acrosomal membrane than the QD. There was also an interaction between treatment and time, at time 48h $p=0.007$ and time 72h $p = 0.018$, with a extender based on skim milk showing better performance. It is concluded that the addition of 0.25g/L casein, as a supplement to the skim milk extender, preserves the integrity of the plasma and acrosomal membrane of goat sperm, submitted to 24 hours of refrigeration. In addition, due to the chemically defined diluter preserving the goat sperm kinetics, after 48 hours of refrigeration, and the integrity of the plasma and acrosomal membrane, up to 24 hours of refrigeration, it is possible to suggest further studies aimed at expanding the benefits of use of this extender, replacing the conventional extender based on skimmed milk for cooling goat semen.

Keywords: Cryopreservation, cryoprotectant, skim milk, extender, casein.

1 INTRODUÇÃO

Com os avanços na biotecnologia do sêmen, houve a necessidade de preservação e transporte de amostras seminais. A refrigeração é uma alternativa para períodos de curto tempo, por ser menos prejudicial aos espermatozoides. Porém, ainda causa injúrias e lesões irreversíveis nestes gametas, decorrentes do choque térmico (WATSON, 2000; AISEN et al., 2005; CSEH et al., 2012).

Conseqüentemente, a busca por melhoria dessa biotécnica se justifica com a finalidade de conservar um elevado número de espermatozoides vivos, assim como manter a capacidade fertilizante dos mesmos (STORNELLI et al., 2005; VÁSQUEZ et al., 2013; ALLAI et al., 2018). Para minimizar o efeito da criopreservação, utiliza-se diluidores de sêmen – os quais possuem componentes que protegem os espermatozoides. Comumente são utilizados diluidores de compostos de origem animal, como gema de ovo e leite desnatado. Sabe-se que esses produtos biológicos consistem em uma variedade de substâncias, não sendo possível conhecer a sua exata composição, além da sua capacidade contaminante e a disseminação de microrganismos patógenos (GIL et al., 2003; AURICH, 2008; ACHARYA et al., 2020).

Com isso, motivou-se a busca por um diluidor que trouxesse os mesmos benefícios protetores aos espermatozoides, porém tivesse definição da composição química para melhor reprodutibilidade e evitar contaminações patógenas. A formulação de um diluidor para refrigeração deve conter carboidratos, como fonte de energia; tampão para manutenção do pH e da osmolaridade em números apropriados; antibióticos, para inibir o crescimento microbiano; e crioprotetores não penetrantes, que, além de terem função nutritiva, protegem as células contra o choque frio, à medida que são refrigeradas até 5 °C (HAFEZ e HAFEZ, 2004; MURPHY et al., 2017).

Em busca de bons crioprotetores, investigou-se a capacidade crioprotetora dos diluidores convencionais. Para gema de ovo, entendeu-se que as lipoproteínas de baixa densidade atuam como principal crioprotetor (MANJUNATH et al., 2002a e 2002b). Quanto ao leite, as micelas de caseína, são consideradas por alguns autores (BERGERON et al., 2006; LUSIGNAN et al., 2011) como o composto responsável pelo efeito protetor. Isso porque esses dois componentes parecem interagir com uma família de proteínas de ligação lipídica (proteínas BSP). As proteínas BSP presentes no plasma

seminal são prejudiciais à preservação do espermatozoide, uma vez que essas proteínas induzem à remoção de colesterol e fosfolípidios da membrana espermática (MANJUNATH et al., 2002a e 2002b; BERGERON et al., 2004).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Criopreservação de Curta Duração

A refrigeração do sêmen ocorre em temperaturas entre 2 a 15 °C, apesar de, na espécie caprina, ser mais comumente utilizada 4 ou 5 °C (LEBOEUF et al., 2000; ACHARYA et al., 2020). O objetivo principal desta técnica é a redução reversível da motilidade e da atividade metabólica dos espermatozoides, pela diminuição lenta e gradual da temperatura (MAZUR et al., 2008; KOPEIKA, 2015). 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, os espermatozoides dispõem de, aproximadamente, 10% de seu metabolismo para sobreviver (GILLAN et al., 2004; DZIEKONSKA et al., 2009; MANJUNATH, 2012).

Amostras refrigeradas de sêmen apresentam mais vantagens do que as amostras congeladas, para utilização em curto período (2 a 4 dias), uma vez que o processo de refrigeração causa menos danos às células espermáticas e permite reduzir a dose inseminante (VISHWANATH e SHANNON, 2000; BATISTA et al., 2009; SHARIDEH et al., 2019). No entanto, em virtude das variações de temperatura (HOLT, 2000; MEDEIROS et al., 2002), é preciso que a refrigeração seja realizada de forma cuidadosa, visando minimizar a ocorrência de lesões irreversíveis nestes gametas, decorrentes do choque térmico (WATSON, 2000; AISEN et al., 2005; CSEH et al., 2012).

O estresse inicial, que ocorre quando os espermatozoides são submetidos à temperatura de refrigeração (5 °C), se deve à transição de fase da membrana plasmática do estado líquido cristalino para o estado de gel (GRAHAM, 1996; MEDEIROS et al., 2002). Quando efetuado de modo inadequado, o processo de refrigeração do sêmen causa choque térmico, que induz a ocorrência de danos espermáticos irreversíveis (GRAHAM, 1996).

2.2 Particularidades do Sêmen Durante a Criopreservação

A criopreservação de espermatozoides é um processo complexo que envolve o equilíbrio de vários fatores para obter resultados satisfatórios (GILMORE et al., 1996; WATSON, 2000; MAEDA et al., 2012). Para garantir um sucesso mínimo, não apenas é necessário uso do diluidor adequado, taxa de diluição de espermatozoides e taxa de refrigeração, mas também o conhecimento da fisiologia do espermatozoide de cada espécie, visando maximizar a recuperação, pós-resfriamento, do espermatozoide e, conseqüentemente, preservar sua capacidade fertilizante (WATSON, 2000; ANZAR et al., 2011).

Os espermatozoides de cada espécie possuem diferente composição de membrana, em termos de colesterol, fosfolipídios e vários domínios proteicos, que interagem de maneira distinta com o ambiente em que estão suspensos, resultando em diferentes temperaturas de fase de transição (WATSON, 2000; ANZAR et al., 2011). De fato, existem variações de animal para animal na composição da membrana espermática, que dependem da nutrição e dos hormônios no ambiente da espermatogênese. Assim, espermatozoides de cada espécie possuem um protocolo ideal de criopreservação (ANDRABI, 2009).

Nos caprinos, a membrana espermática é rica em fosfolipídios (fosfatidilcolina – FC, fosfatidiletanolamina – FE e esfingomiéline), assim como em ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), sendo mais abundantes o oleico, o linoleico, o araquidônico e o docosahexaenoico (DHA), associado a um baixo teor de colesterol (RANA et al., 1991; 1996; SUN et al., 2019). Chakrabarty et al. (2007), ao estudarem os danos de membrana espermática ocorridos durante a criopreservação de espermatozoides obtidos do epidídimo de caprinos, constataram diminuição na quantidade de FC, FE e AGPI, em especial, o DHA, e relacionaram esses achados à redução da função espermática (SUN et al., 2019).

É essencial que uma amostra de sêmen seja diluída adequadamente, para que haja suficiente número de espermatozoides e diluente para proteger as células, para que uma alta taxa de fertilidade possa ser alcançada, usando o menor número de inseminações e o menor número de espermatozoide por inseminação (MANJUNATH, 2012). A taxa de diluição do sêmen ovino, mantido sob refrigeração, também é capaz de

interferir na qualidade espermática, e, segundo Kasimanickam et al. (2007), a melhor concentração para sêmen de pequenos ruminantes é de 200 milhões de espermatozoides/mL.

2.3 Danos Causados no Processo de Criopreservação

O processo de criopreservação expõe as células ao estresse induzido por desequilíbrios osmóticos e de baixa temperatura. A exposição de biomoléculas a temperaturas decrescentes pode levar a alterações conformacionais irreversíveis. O resfriamento altera a estrutura ou conformação das biomoléculas, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, os quais podem ser irreversíveis e prejudicar sua função (STEPONKUS 1984; DROBNIS et al., 1993; GOUSSET et al., 2002).

As membranas celulares consistem em uma mistura de diferentes espécies lipídicas, cada uma com suas propriedades, além de esteróis e proteínas (CAFFREY e HOGAN, 1992). Sua estrutura se organiza em bicamadas de fosfolipídios com grupos hidrofílicos e cadeias acila hidrofóbicas. Sob condições fisiológicas, as membranas estão em uma fase fluida (cristalina líquida), exibindo um grande distúrbio conformacional, no qual são incorporados domínios mais ordenados, conhecidos como 'jangadas'. Estas estruturas são enriquecidas com colesterol e esfingolipídios (BROWN e LONDON, 2000).

A fluidez da membrana e o empacotamento da bicamada lipídica são determinados principalmente pela estrutura das cadeias acila. O comprimento mais curto da cadeia reduz a tendência das cadeias acila em interagir entre si, através das forças de van der Waal, aumentando a fluidez e os distúrbios conformacionais da bicamada (MANTSCH e MCELHANEY, 1991). Além disso, dobras resultantes de ligações duplas em lipídios insaturados dificultam o empacotamento das cadeias acila, o que aumenta a fluidez geral da membrana (ISRAELACHVILI et al., 1980). Os lipídios nas bicamadas sofrem mudanças radicais no estado físico a uma temperatura de transição de fase característica (MANTSCH e MCELHANEY, 1991). Abaixo da temperatura de transição de fase, a bicamada existe no estado de gel, com as cadeias acila compactadas, com interações aumentadas de van der Waal (WOLKERS et al., 2002; OLDENHOF et al., 2015).

Sob condições fisiológicas normais, as membranas estão na chamada “fase cristalina líquida” e são impermeáveis a solutos, como dissacarídeos, enquanto a água pode se difundir livremente através das membranas celulares. O resfriamento resulta em menor fluidez da membrana. Isso pode coincidir com o aumento do vazamento de solutos intracelulares e alterações conformacionais irreversíveis, prejudicando a função celular. Após a remoção da água dos grupos fosfolipídicos, os fosfolipídios ficam compactados na chamada fase de gel, com o aumento das interações de van der Waals entre os grupos CH das cadeias acila (BROWN e LONDON, 2000). Açúcares que possuem grupos OH têm sido implicados na substituição da água, por desidratação das membranas. Além disso, abaixo de um determinado conteúdo de água ou temperatura, eles podem formar um estado vítreo ou vitrificado de proteção (OLDENHOF et al., 2013).

2.4 Diluidores

O objetivo de um diluente de criopreservação é fornecer fontes de energia aos espermatozoides, proteger as células contra danos relacionados à temperatura e manter um ambiente adequado para os espermatozoides sobreviverem temporariamente. Logicamente, cada um dos diferentes componentes que compõem o meio foi investigado separadamente e em combinação, para maximizar a viabilidade e a fertilidade dos espermatozoides. Em geral, um meio de criopreservação de espermatozoides caprinos inclui uso de crioprotetor não penetrante (leite ou gema de ovo), tampão (Tris ou Hepes), um ou mais açúcares (glicose, frutose, lactose, rafinose, sacarose ou trealose), sais (citrato de sódio, ácido cítrico) e antibióticos (penicilina, estreptomicina) (EVANS e MAXWELL, 1987; PURDY, 2006; SILVA et al., 2019).

Diluyente de leite desnatado ou diluyente Tris-gema (CHELUCCI et al., 2015; SILVA et al., 2019) são mais comumente usados para a criopreservação de espermatozoides caprinos. As modificações desses diluentes foram investigadas com resultados variados (BLASH et al., 2000; VIDAL et al., 2013; SALMANI et al., 2014). Esses estudos tentaram responder às perguntas sempre presentes sobre se há meios ideais de criopreservação, se os espermatozoides caprinos têm preferência por algum meio específico e qual a concentração ideal dos constituintes.

Os espermatozoides caprinos sobrevivem à refrigeração e permanecem férteis em meios compostos por uma variedade de constituintes. Muitos açúcares, sais e tampões diferentes, por exemplo, podem ser incluídos em concentrações molares variáveis no meio de refrigeração, sem prejudicar os espermatozoides. Embora a osmolaridade do meio possa variar dentro dos limites, os espermatozoides caprinos parecem preferir um meio hiperosmótico para a refrigeração. A conclusão de que essa é a tonicidade ideal para esse meio foi determinada pela comparação de combinações de tampão Tris e açúcares, em concentrações osmóticas variadas (RITAR e SALAMON, 1982). Além disso, Bowen et al. (1988) relataram que menos danos ocorreram nos espermatozoides de caprinos, quando congelados em diluentes com osmolaridades variando entre 425 e 525 mOsm.

Grandes mudanças no pH do sêmen podem resultar em danos, infertilidade ou mortalidade espermática. Portanto, para manter a viabilidade e a capacidade de fertilização dos espermatozoides, é essencial manter um ambiente adequado, controlando as flutuações de pH nos meios de criopreservação. Uma das funções do plasma seminal é proteger os espermatozoides contra as mudanças no pH (MANN, 1954; ZHAO et al., 2009). Porém, como pode haver interação entre componentes do plasma seminal e constituintes do diluidor, realiza-se o processo de criopreservação com retirada do plasma seminal por centrifugação. Por esse motivo, substâncias que tamponam as alterações de pH são rotineiramente incluídas nos meios de refrigeração, visando minimizar as alterações. Em geral, uma solução tampão para diluentes de espermatozoides caprinos deve ter uma faixa de pH de 6,0 a 8,0, para ser solúvel em água, impermeável à membrana e ter interações mínimas com outros constituintes do diluidor (GOOD et al., 1966; GRAHAM et al., 1972).

Um crioprotetor é incluído em um meio de criopreservação para minimizar as tensões físicas e químicas resultantes do resfriamento, congelamento e descongelamento das células espermáticas (SQUIRES et al., 1999). Os crioprotetores são classificados como penetrantes ou não penetrantes. Um crioprotetor penetrante é permeável à membrana e atua intra e extracelularmente. Para refrigeração, comumente é utilizado crioprotetores não-penetrantes (SALAMON e MAXWELL, 2000; SILVA & GUERRA, 2012).

2.4.1 Leite

O leite integral ou desnatado é usado há muitos anos como diluidor de sêmen. O sucesso desse diluente foi atribuído à sua fração proteica, que pode atuar como um estabilizador contra mudanças no pH (JONES, 1969; WATSON, 1979) e como um agente quelante contra qualquer metal pesado presente (JONES 1969); também pode proteger parcialmente os espermatozoides durante a diluição (BLACKSHAW, 1953) e a redução da temperatura para armazenamento (CHOONG e WALES, 1962).

A caseína parece ser responsável pela proteção dos espermatozoides, mesmo em baixas concentrações de sêmen resfriado (0,6%) e congelado (1,35%), segundo Lagares et al. (2012). Outros componentes do leite, como a lactose (presente em 4,8% de leite bovino), podem melhorar a eficácia dos diluidores, embora não sejam suficientes para proteger os espermatozoides armazenados a apenas 4 °C (CHOONG e WALES, 1962; GARCIA e GRAHAM, 1987). Assim, a natureza do efeito positivo do leite na longevidade dos espermatozoides ainda não está totalmente elucidada (AURICH, 2005; PAGL et al., 2006).

2.5 Diluidor Quimicamente Definido

Um problema dos diluidores de sêmen à base de leite ou gema de ovo é o fato de que esses produtos biológicos podem apresentar variação em sua composição, o que dificulta a padronização de protocolos de criopreservação (LAYEK et al., 2016; ALLAI et al., 2018). Além disso, apenas uma combinação de componentes pode ser necessária para determinar efeitos benéficos na função espermática, enquanto outros componentes podem exercer efeitos prejudiciais, como, por exemplo, a interação entre a fosfolipase A do sêmen caprino e componentes do diluidor à base de gema de ovo. Diluidores contendo apenas componentes com efeitos claramente protetores nos espermatozoides seriam, portanto, uma vantagem (ALAMAARY et al., 2019).

Com crescente ênfase nas questões de biossegurança e no controle de doenças para a remessa internacional de sêmen, os diluidores à base de gema de ovo e leite desnatado tornaram-se contraindicados, por facilitar a transmissão de doenças. Dentre os microrganismos mais susceptíveis estão *E. coli*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*,

Pseudomonas, *Haemophilus*, *Salmonella*, gripe aviária, *Campylobacter*, *Listeria* e *Mycoplasma*, os quais podem ser transmitidos por gema de ovo e leite desnatado (THIBIER e GUERIN, 2000). Além do risco de transmissão da doença, as partículas encontradas na gema de ovo e no leite determinam dificuldades na avaliação e no controle de qualidade do sêmen (STRADAIOLI et al., 2007).

2.5.1 Caseína

Caseína é o termo coletivo para uma família de fosfoproteínas de ligação de cálcio, encontradas no leite de mamíferos (HOLT et al., 2013). Ao contrário da segunda fração de proteínas do leite, as proteínas do soro, as caseínas são insolúveis e representam 80% do total de proteínas do leite bovino (ARTYM et al., 2013; PEREIRA, 2014), o que significa 2,75% do total de componentes do leite. O leite de várias raças de vaca contém caseína em distintas proporções (CAROLI et al., 2009). Todos os peptídeos de caseína são anfifílicos, ou seja, possuem características hidrofílicas e hidrofóbicas, mas diferem no conteúdo de aminoácidos, fósforo e carboidratos (ELZOGHBY et al., 2011; ABD EL-SALAM et al., 2012).

Somente a κ -caseína, contendo duas cisteínas, pode formar ligações dissulfeto (FARRELL et al., 2006; LIVNEY et al., 2010). Estruturas secundárias, tais como hélices α e folhas β , não são frequentes, tornando as caseínas flexíveis, desdobradas ou peptídeos de formato aleatório, capazes de criar ligações intermoleculares, interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (AUDIC et al., 2003; HOLT et al., 2013).

As caseínas exibem atividade semelhante às *small heat-shock proteins* (pequenas proteínas de choque térmico), ou seja, uma molécula de caseína age como acompanhante molecular em relação à outra molécula de caseína ou outra proteína (por exemplo, proteína de soro de leite), estabilizando a proteína a qual está acompanhando e impedindo sua agregação desfavorável (HOLT et al., 2013). Portanto, sob condições adequadas, os peptídeos de caseína estão presentes na forma de um aglomerado estável amorfo, conhecido como micela de caseína (FOX e BRODKORB, 2008; BOUCHOUX et al., 2010; 2015; TREJO et al., 2011).

As caseínas têm capacidade para ligar sequências ricas em fósforo e cálcio e prolina e glutamina, responsáveis por sua afinidade intermolecular (HOLT et al., 2013; PEREIRA, 2014). Uma micela de caseína típica contém milhares de moléculas de caseína, formando 94% da micela. A maioria deles forma complexos termodinamicamente estáveis com fosfato de cálcio, responsável por 6% da micela (ELZOGHBY et al., 2011; HOLT et al., 2013).

Na estrutura de uma micela de caseína, os peptídeos α S1, α S2 e β se acumulam principalmente na parte interna, enquanto a κ -caseína forma a camada "peluda" externa, que estabiliza a micela estericamente, como se pode observar na Figura 1 (ELZOGHBY et al., 2011). Essa estabilização é possível porque a κ -caseína possui uma parte hidrofílica glicosilada, que se projeta para o ambiente aquoso, conhecida como glicomacropéptídeo (JOLLÈS, 1979; GEBHARDT et al., 2011). Curiosamente, essa camada "peluda" está desigualmente distribuída e cobre apenas parcialmente a superfície micelar (DALGLEISH, 1998).

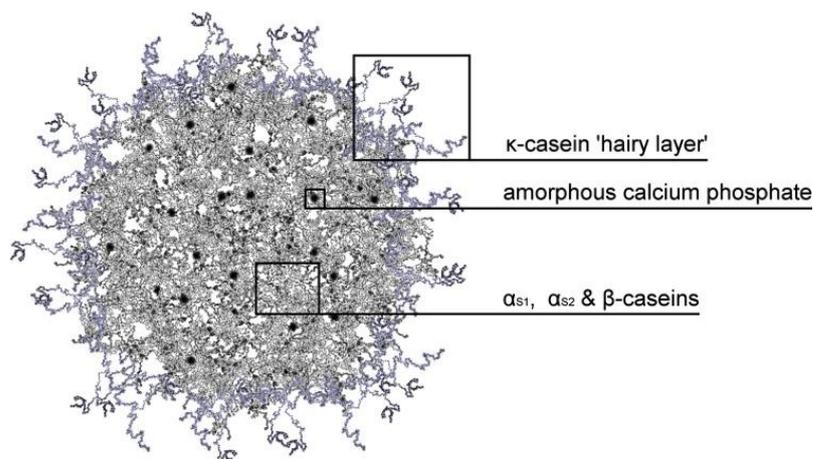


Figura 1. Esquemática das micelas de caseína proposta originalmente por De Kruif e Holt, 2013.

Como o leite desnatado (isento de lipídios) é tão eficiente quanto o leite integral, na proteção de espermatozoides durante o armazenamento do sêmen a 4 °C ou durante a congelação (ALMQUIST et al., 1954; FOOTE et al., 2002), os lipídios não parecem ser os constituintes responsáveis pela proteção oferecida pelo leite. Os constituintes mais protetores do leite seriam, provavelmente, as micelas de caseína (as principais proteínas

do leite). De fato, foi demonstrado que as micelas de caseína isoladas do leite podem proteger espermatozoides de garanhões, cabras, carneiros e touros durante o armazenamento a 4-5 °C (CHOONG & WALES, 1962; MARTIN, 1966; O'SHEA & WALES, 1966; BATELLIER et al., 1997; LEBOEUF et al., 2003). Além disso, as micelas de caseína podem proteger os espermatozoides de touro durante o congelamento na presença de glicerol (CHOONG & WALES, 1963).

Bergeron et al. (2004) sugeriram que os mecanismos de proteção de espermatozoides bovinos pelos diluidores de gema de ovo e leite desnatado parecem compartilhar uma característica comum: o sequestro das proteínas BSP por compostos protetores. No caso do leite, seria uma interação proteína-proteína, que leva à proteção dos espermatozoides. Propõe-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 permitiriam que algumas proteínas BSP se ligassem à membrana espermática e mantivessem a fertilidade do esperma (MANJUNATH et al., 2002; BERGERON et al., 2004).

Curiosamente, o leite desnatado é usado como diluidor para espermatozoides de diversas espécies de mamíferos, como ovinos (SALAMON & MAXWELL, 2000), caprinos (LEBOEUF et al., 2000), equinos (AURICH et al., 1996) e bubalinos (SANSONE et al., 2000). Como os homólogos da BSP foram identificados no sêmen de todas essas espécies (GARCIA & GRAHAM, 1987), pode-se postular que o mecanismo de proteção dos espermatozoides pelo leite possa ser semelhante para todos os mamíferos.

2.6 Análises do Sêmen

Uma análise convencional do sêmen tenta descobrir a qualidade de cada amostra. Para isso, é necessário avaliar as características microscópicas: concentração dos espermatozoides no líquido seminal, sua motilidade, morfologia, vitalidade e integridade de membrana. Tudo com o objetivo de descobrir se o material analisado é fértil e se o animal pode ser usado como reprodutor (MADRIGAL-VALVERDE et al., 2020).

Tradicionalmente, um técnico de laboratório bem treinado faz a análise, começando pela visualização macroscópica da amostra: cor, odor, pH, liquefação completa. A seguir, a análise microscópica deve ser feita a partir da contagem de espermatozoides. E, posteriormente, uma das etapas mais difíceis no nível visual, a análise da motilidade, em que o analisador, através da observação óptica da amostra, deve ser capaz de distinguir a porcentagem de espermatozoides móveis com movimento progressivo e o percentual móvel total de espermatozoides. Tudo isso em uma amostra contendo espermatozoides móveis e estáticos, incorporados no líquido seminal com várias outras partículas (AMANN & WABERSKI, 2014).

O fato de utilizar a análise em microscopia ótica, ou seja, delegar toda a responsabilidade a uma pessoa que faz uma visualização subjetiva, por meio de microscópio e registra manualmente todos os resultados em um formulário, permite a existência de falhas na análise. E é sabida a existência de variações nos resultados se a mesma amostra for analisada por diferentes experiências e pessoas bem treinadas e, até mesmo, pela mesma pessoa em diferentes momentos do dia (AMANN & WABERSKI, 2014; MADRIGAL-VALVERDE et al., 2020).

2.6.1 Sistema de Análise Espermática Assistida por Computador

O sistema de análise espermática assistida por computador (CASA) é utilizado para análise do sêmen. Esse sistema permite a avaliação precisa, repetitiva e automática dos parâmetros espermáticos: motilidade, concentração, morfologia, fragmentação do DNA, vitalidade e reação do acrossoma (VERSTEGEN et al., 2002).

Sistemas CASA projetam imagens sucessivas de uma suspensão de espermatozoides em um conjunto de detectores; detectam objetos com base na intensidade de pixels em um quadro ou dispersão de luz; e usam software especial para extrair as informações desejadas e devolver o resultado para as análises feitas (AMANN & KATZ, 2004). Os sistemas fornecem muitas variáveis para o movimento ou a morfologia de cada espermatozoide estudado. A precisão e a sensibilidade de cada medida de saída são determinadas pelo software do sistema, mas cada valor de saída para movimento ou concentração de espermatozoides reflete o meio de suspensão de

espermatozoides, a profundidade da câmara de amostra, as configurações de hardware e o instrumento (GRAHAM & MOCÉ, 2005).

O CASA não pode prever com precisão a 'fertilidade' que será obtida com uma amostra de sêmen. No entanto, quando cuidadosamente validados, os atuais sistemas CASA fornecem informações importantes para garantir a qualidade do sêmen e para o entendimento da diversidade das respostas espermáticas às mudanças no microambiente na pesquisa (GIL et al., 2000).

2.6.2 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica usada para detectar e medir características físicas e químicas de uma população de células ou partículas. Nesse processo, uma amostra contendo células ou partículas é suspensa em um fluido e injetada no citômetro de fluxo (LARSSON, 2000). A amostra é focada no fluxo ideal de uma célula por vez, através de um raio laser, onde a luz dispersa é característica das células e de seus componentes. As células são frequentemente rotuladas com marcadores fluorescentes, para que a luz seja absorvida e depois emitida em uma faixa de comprimentos de onda. Dezenas de milhares de células podem ser examinadas rapidamente e os dados coletados são processados por um computador (GILLAN et al., 2005).

Sua aplicação nas análises do sêmen aumentou ao longo dos anos (GILLAN et al., 2005), permitindo a observação de características físicas do espermatozoide, como tamanho da célula, forma e complexidade interna (LARSSON & RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2000). Uma ampla gama de sondas fluorescentes pode ser usada como marcadores na citometria de fluxo, podendo ser utilizado para avaliação de características como viabilidade celular, integridade acrossomal, função mitocondrial, status de capacitação, fluidez da membrana e estado do DNA (GILLAN et al., 2005), de forma objetiva, com um alto nível de repetibilidade experimental. Além disso, permite a associação de fluorocromos, sendo vários atributos da mesma célula avaliados simultaneamente (LARSSON & RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2000), tornando mais precisa a previsão de fertilidade da amostra analisada (AMMAN & HAMMERSTEDT, 1993).

- Integridade de Membrana Plasmática e Acrossomal

O iodeto de propídio (IP) é uma sonda fluorescente usada para avaliar a integridade da membrana plasmática. Possui afinidade por DNA e fluoresce em vermelho no núcleo da membrana plasmática danificada (GRAHAM et al., 1990). O IP é muito estável e tem sido utilizado como sonda fluorescente para microscopia de epifluorescência (THOMAS et al., 1997; CELEGHINI et al., 2007, 2008;), bem como para citometria de fluxo (PINTADO et al., 2000; ARRUDA et al., 2003).

A integridade do acrossoma pode ser verificada por diferentes técnicas de fluorescência (THOMAS et al., 1997). A aglutinina de amendoim (PNA) foi usada para avaliar o estado acrossomal do espermatozoide e a reação do acrossoma. O PNA se liga exclusivamente à membrana acrossomal externa destes gametas, como foi estabelecido por microscopia eletrônica de transmissão. A aglutinina de amendoim conjugada com isotiocianato de fluorescência (FITC-PNA), que se liga especificamente ao açúcar Galactosyl β -1,3 N-acetilgalactosamina nas membranas acrossomais (MORTIMER et al., 1987), tem sido usada como uma sonda para visualizar a integridade acrossomal (ALMADALY et al., 2012; KISHIDA et al., 2015).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL-SALAM, M. H.; EL-SHIBINY, S. Formation and potential uses of milk proteins as nano delivery vehicles for nutraceuticals: A review. **Int J Dairy Tech**, v. 65, p. 13-21, 2012.

ACHARYA, M.; BURKE, J.M.; RORIE, R.W. Effect of Semen Extender and Storage Temperature on Motility of Ram Spermatozoa. **Adv Reprod Sci**, v. 8, p. 14-30, 2020.

AISEN, E.G.; QUINTANA, M.; MEDINA, V.; MORELLO, H.; VENTURINO, A. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. **Cryobiology**, v. 50, p. 239-249, 2005.

ALAMAARY, M.S.; WAHID, H.; ALI, M.; HIEW, M.W.H.; ADAMU, L.; PETER, I.D.; Effects of four extenders on the quality of frozen semen in Arabian stallions, **Vet World**, v. 12, p. 34-40, 2019.

ALLAI, L.; BENMOULA, A.; MAIA, M.; NASSER, B.; AMIRI, B.E. Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate, **Anim Reprod Sci**, v. 192, p. 6-17, 2018.

ALMADALY, E.; EL-KON, I.; HELEIL, B.; EL- FATTOUH, S.; MUKOUJIMA, K.; UEDA, T.; HOSHINO, Y.; TAKASU, M. Methodological factors affecting the results of staining frozen–thawed fertile and sub fertile Japanese Black bull spermatozoa for acrosomal status. **Anim Reprod Sci**, v. 136, p. 23-32, 2012.

ALMQUIST, J.O.; FLIPSE, R.J.; THACKER, D.L. Diluters for bovine semen. IV. Fertility of bovine spermatozoa in heated homogenized milk and skim milk. **J Anim Sci** v. 13, p.1303–1307, 1954.

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

AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H. In vitro evaluation of sperm quality: An opinion. **J Androl**, v. 14, p. 397-406, 1993.

ANDRABI, S. M. H. Factors Affecting the Quality of Cryopreserved Buffalo (*Bubalus bubalis*) Bull Spermatozoa. **Reprod Dom Anim**, v. 44, p. 552–569, 2009.

ANZAR, M.; KROETSCH, T.; BOSWALLA, L.; Cryopreservation of bull semen shipped overnight and its effect on post-thaw sperm motility, plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and normal acrosomes. **Anim Reprod Sci**, v. 126, p. 23-31, 2011.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; SOUZA, L.W.O.; NASCIMENTO, J.; ANDRADE, A.F.C.; RAPHAEL, C.F.; GARCIA, A.R. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. **Acta Sci Vet**, v. 33, p. 145-150, 2003.

ARTYM, J.; ZIMECKI, M. Milk-derived proteins and peptides in clinical trials. **Post Hig Med Dosw**, v. 67, p. 800-816, 2013.

AUDIC, J.L.; CHAUDER, B.; DAUFIN, G.; Non-food applications of milk componentes and diary co-products: a review. **Lait**, v. 83, p. 417-438, 2003.

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Anim Reprod Sci**, v. 89, p. 65-75, 2005.

AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. **Anim Reprod Sci**, v. 107, p. 268-275, 2008.

AURICH, J.E.; KUHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma affects ϵ membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, v. 46, p. 791–797, 1996.

BATELLIER, F.; MAGISTRINI, M.; FAUQUANT, J.; PALMER, E. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 48, p. 391–417, 1997.

BATISTA, A.M.; SILVA, S.V.; SOARES, A.T.; WISCHRAL, A.; GUERRA, M.M.P. Efeito dos métodos Swim-up e Percoll sobre a viabilidade espermática de amostras criopreservadas de sêmen caprino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 18., 2009, Belo Horizonte, Brasil. **Anais... CBRA**, 2009.

BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New Insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Mol Reprod Dev**, v. 73, p. 1338-1344, 2006.

BERGERON, A.; CRETE, M.H.; BRINDLE, Y.; MANJUNATH, P. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biol Reprod**, v. 70, p. 708–717, 2004.

BLACKSHAW, A.W. The motility of ram and bull spermatozoa in dilute suspension. **J Gen Physiol**, v. 36, p. 449-62, 1953.

BLASH, S.; MELICAN, D.; GAVIN, W.; Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. **Theriogenology**, v. 54, p. 899-905, 2000.

BOUCHOUX, A.; GÉSAN-GUIZIOU, G.; PÉREZ, J.; CABANE, B. How to squeeze a sponge: casein micelles under osmotic stress, a SAXS study. **Bioph J**, v. 99, p. 3754–3762, 2010

BOUCHOUX, A.; VENTUREIRA, J.; GÉSAN-GUIZIOU, G.; GARNIER-LAMBROUIN, F.; QU, P.; PASQUIER, C.; PÉZENNEC, S.; SCHWEINS, R.;

- CABANE, B. Structural heterogeneity of milk casein micelles: a SANS contrast variation study. **Soft Matter**, v. 11, p. 389–399, 2015.
- BOWEN, R. A.; OLAR, T. T.; PICKET, B. W. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedure on post-thaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. **Theriogenology**, v. 31, p. 451-461, 1988.
- BROWN, D.A.; LONDON, E. Structure and function of sphingolipid and cholesterol-rich membrane rafts. **J of Biol and Chem**, v. 34, p. 17221-17224, 2000.
- CAFFREY, M.; MOYNIHAN, D.; HOGAN, J. A database of lipid phase transition temperatures and enthalpy changes. DMPC data subset analysis. **Chem Phys Lipids**, v. 57, p. 275-291, 1992.
- CAROLI, A. M.; CHESSA, S.; ERHARDT, G.J. Invited review: milk protein polymorphisms in cattle: effect on animal breeding and human nutrition. **J Dairy Sci**, v. 92, p. 5335–5352, 2009.
- CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ALBUQUERQUE, R.; SILVA, F.H.A.; FARIA, D.E.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F. Utilization of fluorescent probe association for simultaneous assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes in fowl spermatozoa. **Braz J Poult Sci**, v. 9, p. 143-149, 2007.
- CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; RODRIGUES, P.H.M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Anim Reprod Sci**, v. 104, p. 119-131, 2008.
- CHAKRABARTY, J.; BANERJEE, D.; PAL, D.; GHOSH, A.; MAJUMDER, C. Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. **Cryobiology**, v. 54, p. 27-35, 2007.
- CHELUCCI, S.; PASCIU, V.; SUCCU, S.; ADDIS, D.; LEONI, G.G.; MANCA, M.E.; NAITANA, S.; BERLINGUER, F. Soybean lecithin-based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 83, p. 1064-74, 2015.
- CHOONG, C.H. AND WALES, R.G. The effect of cold shock on spermatozoa. **Aust J Biol Sci**, v. 15, p. 543–551, 1962.
- CHOONG, C.H.; WALES, R.G. The use of various diluents for deepfreezing bull spermatozoa. **Aust J Biol Sci**, v. 16, p. 896–904, 1963.
- CSEH, S.; FAIGL, V.; AMIRIDIS, G.S. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. **Anim Reprod Sci**, v. 130, p. 187-192, 2012.

- DALGLEISH, D. G. Casein micelles as colloids: surface structures and stabilities. **J Dairy Sci**, v. 81, p. 3013-3018, 1998.
- DROBNIS, E.Z.; CROWIE, L.M.; BERGER, T.; ANCHORDOGUY, T.J.; OVERSTREET, J.W.; CROWIE, J.H. Cold shock damage is due to lipid phase transition in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. **J Exp Zool**, v. 265, p. 432-437, 1993.
- DZIEKOŃSKA, A.; FRASER, L.; STRZEŻEK, J. Effect of different storage temperatures on the metabolic activity of spermatozoa following liquid storage of boar semen. **J Anim Feed Sci**, v. 18, p. 638-649, 2009.
- ELZOGHBY, A.O.; EL-FOTOH, W.S.A.; ELGINDY, N.A. Caseinbased formulations as promising controlled release drug delivery systems. **J Control Rel**, v. 153, p. 206–216, 2011.
- EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. **Syd: Butterw**, v. 31, p. 194, 1987. [H.M.FarrellJr.E.L.MalinE.M.BrownP.X.Qi](#)
- FARRELL JR, H.M.; MALIN, E.L.; BROWN, E.M.; QI, P.X. Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? **Cur Op Col Interf Sci**, v. 11, p. 135-147, 2006.
- FOOTE, R.H.; BROCKETT, C.C.; KAPROTH, M.T. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. **Anim Reprod Sci**, v. 71, p. 13–23, 2002.
- FOX, P.F.; BRODKORB, A. The Casein Micelle: Historical Aspects, Current Concepts and Significance. **Int Dairy J**, v. 18, p. 677-684, 2008.
- GARCIA, M.A.; GRAHAM, E.F. Oialysis of bovine semen and it effect on fre h and freeze-thawed spermatozoa. **Cryobiology**, v. 24, p. 446-54, 1987.
- GEBHARDT, R.; TAKEDA, N.; KULOZIK, U.; DOSTER, W. Structure and Stabilizing Interactions of Casein Micelles Probed by High-Pressure Light Scattering and FTIR, **J Phys Chem**, v. 115, p. 2349–2359, 2011.
- GIL, J.; JANUSKAUSKAS, A.; HÅÅRD, M.C.H.; HÅÅRD, M.G.M.; JOHANISSON, A.; SÖDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MÁRTINEZ, H. Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biciphos-Plus® and Triladyl®. **Reprod Domest Anim**, v. 35, p. 69-77, 2000.
- GIL, J; LUNDEHEIM, N; SÖDERQUIST, L.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. **Theriogenology**, v. 59, p. 1241-1255, 2003.
- GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, p. 445-457, 2005.

- GILLAN, L.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. **Reprod, Fert Dev**, v. 16, p. 447–54, 2004.
- GILMORE, J.A.; DU, J.; TAO, J.; CRITSER, J.K. Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. **J Reprod Fert**, v. 107, p. 97-95, 1996.
- GOOD, N.E.; WINGET, G.D.; WINTER, W.; CONNOLLY, T.N.; IZAWA, S.; SINGH, R.M. Hydrogen ion buffers for biological research*. **Biochemistry**, v. 5, p. 467-477, 1966.
- GOUSSET, K.; WOLKERS, W.F.; TSVETKOVA, N.M.; OLIVER, A.E.; FIELD, C.L.; WALKER, N.J.; CROWE, J.H.; TABLIN, F. Evidence for a physiological role for membrane rafts in human platelets. **J Cell Phys**, v. 190, p. 117–128, 2002.
- GRAHAM, E.F.; CRABO, B.G.; BROWN, K.I. Effect of some zwitter ion buffers on the freezing and storage of spermatozoa I. **Bull J Dairy Sci.**, v. 55, p. 372-378, 1972.
- GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Vet Clin North Am: Eq Pract**, v. 12, p. 131-147, 1996.
- GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biol Reprod**, v. 43, p. 55-64, 1990.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprod Anim**, 7.ed. Barueri: Manole, p. 97-103, 2004.
- HOLT W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Anim Reprod Sci**, v. 62, p. 3-22, 2000.
- HOLT, C.; CARVER, J.A.; ECKROYD, H.; THORN, D.C. Invited review: Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, and behavior in foods. **J Dairy Sci**, v. 96, p. 6127–6146, 2013.
- ISRAELACHVILI, J.N.; MARCELLJA, S.; HORN, R.G. Physical principles of membrane organization, **Quart Rev Biophys**, v. 13, p. 121, 1980.
- JOLLÈS, P. Cow κ -casein: structure of the carbohydrate protein. **Biochim Biophys Acta**, v. 576, p. 339–346, 1979.
- JONES, R.C. Studies of the suitability of preparations of ewe and cow milk for storing ram spermatozoa at 37.5 and -79°C. **Aust J Biol Sci**, v. 22, p. 983-900, 1969.
- KASIMANICKAM, R.; KASIMANICKAM, V.; THATCHER, C.D.; NEBEL, R.L.; CASSEL, B.G. Relationships among lipid peroxidation, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, sperm parameters, and competitive index in dairy bulls. **Theriogenology**, v. 67, p. 1004-1012, 2007.

- KOPEIKA, J; THORNHILL, A.; KHALAF, Y.; The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence, **Human Reprod Up**, v. 21, p. 209–227, 2015.
- LARSSON, B. AND RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? **Anim Reprod Sci**, v. 60/61, p. 327-336, 2000.
- LAYEK, S.S.; MOHANTY, T.K.; KUMARESAN, A.; PARKS, J.E. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean-based extenders. **Anim Reprod Sci**, v. 172, p. 1-9, 2016.
- LEBOEUF, B.; GUILLOUET, P.; BATELLIER, F.; BERNELAS, D.; BONNE, J.L.; FORGERIT, Y.; RENAUD, G.; MAGISTRINI, M. Effect of native phosphocaseinate on the in vitro preservation of fresh semen. **Theriogenology**, v. 60, p. 867–877, 2003.
- LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Anim Reprod Sci**, v. 62, p. 113-141, 2000.
- LIVNEY, Y.D. Milk proteins as vehicles for bioactives, **Cur Op in Col & Interf Sci**, v. 15, p. 73-83, 2010.
- LUSIGNAN, M.F.; BERGERON, A.; LAFLEUR, M.; MANJUNATH, P. The major proteins of bovine seminal plasma interact with caseins and whey proteins of milk extender. **Bio of Reprod**, v. 85, p. 457-464, 2011.
- MADRIGAL-VALVERDE, M.; CALDEIRA, C.; BOMPART, D.; NÚÑEZ DE MURGA, J.; ARNAU, S.; SOLER, C. Effect of frame rate capture frequency on sperm kinematic parameters and subpopulation structure definition in boars, analysed with a CASA-Mot system. **Reprod Dom Anim**, v. 54, p. 167–175, 2019.
- MAEDA, T.; GARCÍA-CONTRERAS, R.; PU, M.; SHENG, L.; GARCIA, L.R.; TOMAS, M. Quorum quenching quandary: resistance to antivirulence compounds. **ISME J**, v. 6, p. 493–501, 2012.
- MANJUNATH, P. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. **Anim Reprod**, v. 9, n. 4, p. 809-815, 2012.
- MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MÉNARD, M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biol of Reprod**, v. 67, p. 1250 – 1258, 2002.
- MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipids-binding proteins. **Reprod Imm**, v. 53, p. 109-119, 2002.
- MANN, T. The Biochemistry of Semen. **London: Methuen**, p. 195-268, 1954.
- MANTSCH, H.H.; MCELHANEY, R.N.; Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy. **Chem Phys Lip**, v. 57, p. 213-226, 1991.

- MARTIN, I.C.A. Diluents for the preservation of ram spermatozoa. I. Diluents used at 378C and 58C containing casein. **Aust J Biol Sci**, v. 19, p. 645–653, 1966.
- MAZUR, P.; LEIBO, S.P.; SEIDEL, J.R.G.E. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. **Bio of Reprod**, v. 78, n. 1, p. 2-12, 2008.
- MEDEIROS, A.S.L.; GOMES, G.M.; CARMO, M.T.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Cryopreservation of stallion sêmen using different amides. **Theriogenology**, v. 58, p. 273-76, 2002.
- MORTIMER, S.T. Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. **J Androl**, v. 11, p. 195-203, 1990.
- MURPHY, E. M.; MURPHY, C.; O'MEARA, C.; DUNNE, G.; EIVERS, B.; LONERGAN, P. AND FAIR, S. A comparison of semen diluents on the in vitro and in vivo fertility of liquid bull semen. **J. Dairy Sci**, v. 100, p. 1541–1554, 2017.
- O'SHEA, T.; WALES, R.G. Effect of casein, lecithin, glycerol, and storage at 58C on diluted ram and bull semen. **Aust J Biol Sci**, v. 19, p. 871– 882, 1966.
- OLDENHOF, H.; GOJOWSKY, M.; WANG, S.; HENKE, S.; YU, C.; ROHN, K.; WOLKERS, W.F.; SIEME, H. Osmotic stress and membrane phase changes during freezing of stallion sperm: mode of action of cryoprotective agents. **Biol Reprod**, v. 88, p. 68, 2013.
- OLDENHOF, H.; HEUTELBECK, A.; BLÄSSE, A.K.; BOLLWEIN, H.; MARTINSSON, G.; WOLKERS, W.F.; SIEME, H. Tolerance of spermatozoa to hypotonic stress: role of membrane fluidity and correlation with cryosurvival. **Reprod Fert Dev**, v. 27, p. 285-293, 2015.
- PAGL, R.; AURICH, C.; KANKOFER, M. Anti-oxidative status and semen quality during cooled storage in stallions. **J Vet Med**, v. 53, p. 486-489 2006.
- PEREIRA, P. C. Milk nutritional composition and its role in human health. **Nutrition**, v. 30, p. 619-627, 2014.
- PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; ROLDAN, E.R.S. Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or the eosin: accuracy in the assessment of cell viability. **J Reprod Fert**, v. 118, p. 145-152, 2000.
- PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Sm Rumi Res**, v. 63, p. 215-225, 2006.
- RANA, A.P.; MAJUMDER, G.C.; MISRA, S.; GHOSH, A. Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. **Bioch Bioph**, v. 1061, p. 185-196, 1991.

- RANA, K.J. Preservation of gametes. In: BROMAGE, N.R. and ROBERTS, R.J. Broodstock management and egg and larval quality. **Oxf Blac Sci**, v. 36, p. 53-75, 1996.
- RANA, K.J. Preservation of gametes. In: BROMAGE, N.R.; ROBERTS, R.J. Broodstock management and egg and larval quality. **Oxf Blac Sci**, v. 36, p. 53-75, 1996.
- RITAR, A.J.; SALAMON, S. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent and the survival of fresh and frozen spermatozoa of Angora goat. **Aust J of Bio Sci**, v. 35, p. 305-312, 1982.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Anim Reprod Sci** v. 62, p. 77–111, 2000.
- SALMANI, H.; TOWHIDI, A.; ZHANDI, M.; BAHREINI, M.; SHARAFI, M. In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen, **Cryobiology**, v. 68, p. 276–280, 2014.
- SALMANI, H.; TOWHIDI, A.; ZHANDI, M.; BAHREINI, M.; SHARAFI, M. In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk-based diluents for cryopreservation of goat semen, **Cryobiology**, v. 68, p. 276–280, 2014.
- SANSONE, G.; NASTRI, M.J.; FABBROCINI, A. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. **Anim Reprod Sci**, v. 62, p. 55–76, 2000.
- SHARIDEH, H.; ZHANDI, M.; ZENIOALDINI, S.; ZAGHARI, M.; SADEGHI, M.; The effect of coenzyme Q10 on rooster semen preservation in cooling condition, **Theriogenology**, v. 129, p. 103-109, 2019.
- SILVA, E.C.B.; GUERRA, M.M.P. Sondas fluorescentes: um avanço na avaliação da integridade estrutural e funcional de espermatozoides. **Rev de Ciênc Agrovet**, v. 11, p. 162-169, 2012.
- SILVA, R.A.J.A.; BATISTA, A.M.; ARRUDA, L.C.P.; SOUZA, H.M.; NERY, I.H.; GUERRA, M.M.P. Concentration of soybean lecithin affects short-term storage success of goat semen related with seminal plasma removal. **Anim Reprod**, v. 16, p. 895-901, 2019.
- SQUIRES, E.L.; McCUE, P.M.; VANDERWALL, D. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 51, p. 91-104, 1999.
- STEPONKUS, P.L.; DOWGERT, M.F.; GORDON-KAMM, W.J. Destabilization of the plasma membrane of isolated plant protoplasts during freeze–thaw cycle: the influence of cold acclimation. **Cryobiology**, v. 20, p. 448-465, 1984.

STORNELLI, M.C.; TITTARELLI, C.M.; SAVIGNONE, C.A.; STORNELLI, M.A. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. **Ana Vet**, v. 25, n. 2, p. 28-35, 2005.

STRADAIOLI, G.; NORO, T.; SYLLA, L.; MONACI, M. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. **Theriogenology**, v. 67, p. 1249-1255, 2007.

SUN, B.; MESSERLIAN, C.; SUN, Z.H.; DUAN, P.; CHEN, H.G.; CHEN, Y.J.; WANG, P.; WANG, L.; MENG, T.Q.; WANG, Q.; ARVIZU, M.; CHAVARRO, J.E.; WANG, Y.X.; XIONG, C.L.; PAN, A. Physical activity and sedentary time in relation to semen quality in healthy men screened as potential sperm donors. **Human Reprod**, v. 34, p. 2330-2339, 2019.

THIBIER, M.; GUÉRIN, B. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. **Anim Reprod Sci**, v. 62, p. 233-251, 2000.

THOMAS, C.A.; GARNER, D.L.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in Cryopreserved bovine spermatozoa. **Biol Reprod**, v. 56, p. 991-998, 1997.

TREJO, R.; DOKLAND, T.; JURAT-FUENTES, J.; HARTE, F. Cryo-transmission electron tomography of native casein micelles from bovine milk. **J Dairy Sci**, v. 94, p. 5770-5775, 2011.

VASQUEZ, J.H.; NUNEZ, V.H.; FLORENTINI, E.A.; GONZALES, J.M.; CAMARGO, L.A.; VALDIVIA, M.E. Effects of five cryoprotective agents on quality of sheep epididymal spermatozoa during pre-freezing. **Live Sci**, v. 152, n. 1, p. 94-99, 2013.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K.; Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002.

VIDAL A.H.; BATISTA A.M.; SILVA E.C.B.; GOMES W.A.; PELINCA, M.A.; SILVA S.V.; GUERRA, M.M.P; Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation. **Sm Rumin Res**, v. 109, p. 47-51, 2013.

VISHWANATH, R.; P. SHANNON. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Anim Reprod Sci**, v. 62, p. 23-53, 2000.

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

WATSON, P.F.; MARTIN, I.C.A. Effects of egg yolk, glycerol and the freezing rate on the viability and acrossomal structures of frozen ram spermatozoa. **Aust J Biol Sci**, v. 28, p. 153-159, 1979.

WOLKERS, W.F.; CROWE, L.M.; TSVETKOVA, N.M.; TABLIN, F.; CROWE, J.H.: In situ assessment of erythrocyte membrane properties during cold storage. **Mol Membr Biol**, v. 19, p. 59–65, 2002.

YI, Y.J.; IM, G.S.; PARK, C.S. Lactose egg yolk diluent supplemented with Nacetyl-D-glucosamine affect acrossome morphology and motility of frozen-thawed boar semen. **Anim Reprod Sci**, v. 74, p. 187-194, 2002.

ZHAO, B.; TAKAMI, M.; YAMADA, A.; WANG, X.; KOGA, T.; HU, X.; TAMURA, T.; OZATO, K.; CHOI, Y.; IVASHKIV L.B. Interferon regulatory factor-8 regulates bone metabolism by suppressing osteoclastogenesis. **Nat Med**, v. 15, p. 1066–1071, 2009.

4 ARTIGO

Uso de caseína como suplemento ou em substituição ao diluidor convencional (leite desnatado) para refrigeração de sêmen caprino

Use of casein as supplement or as substitute for the conventional extender (skim milk) in cooling of goat semen

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

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. Fax: 3320 6057. E-mail: mmpguerra@pq.cnpq.br and madalena.guerra@ufrpe.br

Resumo

Os diluidores de sêmen à base de leite ou gema de ovo não apresentam uma 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 utilizar a caseína como suplemento ou em substituição ao diluidor convencional (leite desnatado) para refrigeração de sêmen caprino. Para tanto, foram colhidas amostras de sêmen de três bodes, sexualmente maduros, e as colheitas foram realizadas pelo método de vagina artificial, na presença de uma fêmea como manequim. O sêmen foi diluído (200×10^6 espermatozoide/mL) de acordo com os experimentos. Exp. **I** - diluidor à base de leite desnatado (LD), adicionado ou não de diferentes concentrações de caseína (0.25g/L e 0.5g/L); Exp. **II** - diluidor à base de leite desnatado ou diluidor quimicamente definido (QD) à base de caseína (0.5g/L). Imediatamente após diluição, as amostras foram armazenadas em geladeira (5 °C) e analisadas após estabilização (0h) e após 24, 48 e 72 horas de armazenamento, quanto a cinética espermática (CASA) e integridade de membrana plasmática e acrossomal (citometria de fluxo). No Exp. **I**, observou-se que a adição de caseína não teve efeito sobre os parâmetros cinéticos, mas após 24h o diluidor suplementado com caseína na concentração de 0.25g/L apresentou maior integridade de membrana plasmática e acrossomal ($p=0.013$), quando comparado ao diluidor sem adição de caseína. No Exp. **II** – Os parâmetros cinéticos analisados pelo CASA não apresentaram diferença significativa, com exceção da LIN (linearidade), onde no tempo de 72h o diluidor à base de leite teve melhor desempenho que o QD ($p=0.016$). Na integridade de membrana plasmática e acrossomal observou-se efeito fixo de tratamento ($p=0.008$), onde o diluidor à base de leite determinou maior integridade na membrana plasmática e acrossomal do que o QD. Também houve interação tratamento \times tempo, no tempo 48h $p=0.007$ e no tempo 72h $p=0.018$, com diluidor à base de leite desnatado apresentando melhor desempenho. Conclui-se que a adição de caseína a 0.25g/L, como suplementação ao diluente à base de leite desnatado, preserva a integridade da membrana plasmática e acrossomal de espermatozoides caprinos, submetidos a 24 horas de refrigeração. Além disso, em virtude do diluidor quimicamente definido preservar a cinética de espermatozoides caprinos, após 48 horas de refrigeração, e a integridade de membrana plasmática e acrossomal, até 24 horas de refrigeração, é possível sugerir a realização de mais estudos visando ampliar os benefícios da utilização deste diluidor, em substituição ao diluidor convencional à base de leite desnatado para refrigeração de sêmen caprino.

Introdução

A necessidade do uso da criopreservação do sêmen está relacionada aos grandes benefícios à reprodução animal, facilitando a distribuição do material genético e a utilização do sêmen no melhor momento para a inseminação (SALAMON e MAXWELL, 1995; WATSON, 2000; FICKEL et al., 2007, RAJABI et al., 2014). A refrigeração do sêmen é utilizada visando manter seu potencial fertilizante por período

curto, devido à redução do metabolismo dos espermatozoides. Entretanto, a conservação dos espermatozoides pelo frio torna-se um problema (ORTEGA et al., 2003; LARBI et al., 2018), devido a alterações na fisiologia espermática em nível ultraestrutural, bioquímico e funcional, que resultam na redução de motilidade, viabilidade e capacidade fertilizante dos espermatozoides (SALAMON e MAXWELL, 1995; LEBOEUF et al., 2000; RAJABI et al., 2014).

Conseqüentemente, a busca por melhoria dessa biotécnica se justifica com a finalidade de conservar um elevado número de espermatozoides vivos, assim como manter a capacidade fertilizante dos mesmos (STORNELLI et al., 2005; VÁSQUEZ et al., 2013; LARBI et al., 2018). Com o objetivo de melhoria dos resultados obtidos com a refrigeração do sêmen, têm sido testados diluentes com diferentes composições, para diferentes espécies (VÁSQUEZ et al., 2013), incluindo os pequenos ruminantes (COLAS, 1975; TASSERON et al., 1977; SALAMON e MAXWELL, 2000; RAJABI et al., 2014), sendo o leite e a gema de ovo a base dos diluidores seminais mais comumente utilizados. Porém, existem muitas limitações ao uso desses diluidores de origem animal, devido à grande variabilidade de seus constituintes biológicos (AURICH et al., 2007), além da sua capacidade contaminante e a disseminação de microrganismos patógenos (GIL et al., 2003; ACHARYA et al., 2019).

Essas adversidades estimularam o desenvolvimento de diluidores quimicamente definidos, minimizando os riscos da falta de padronização da composição química e permitindo o processamento mais adequado e seguro do sêmen. A formulação de um diluidor para refrigeração deve conter carboidratos, como fonte de energia; tampão para manutenção do pH e da osmolaridade em números apropriados; antibióticos para inibir o crescimento microbiano; e crioprotetores não penetrantes que, além de terem função nutritiva, protegem as células contra o choque frio, à medida que são refrigeradas até 5 °C (HAFEZ e HAFEZ, 2004; MAIA et al., 2014; MURPHY et al., 2017).

A principal proteína do leite, conhecida como caseína, é considerada o composto responsável pelo efeito protetor nos diluidores à base de leite (BERGERON et al., 2007). Acredita-se que sua principal ação é impedir a perda lipídica da membrana espermática (BATELLIER et al., 1997; PAGL et al., 2006; BERGERON et al., 2007; LUSIGNAN et al., 2011). Dessa forma, as micelas de caseína parecem ser responsáveis pela proteção do espermatozoide, mesmo em baixas concentrações no sêmen

refrigerado (LAGARES et al., 2012). Por conseguinte, o objetivo principal do estudo foi avaliar a ação da caseína, suplementada ao diluidor à base de leite ou no desenvolvimento de um diluidor quimicamente definido, utilizando como modelo experimental o sêmen caprino.

Material e Métodos

Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), com exceção do fosfato salino tamponado (PBS), adquirido da Gibco® (Life Technologies, EUA). O diluidor de criopreservação do sêmen à base de leite desnatado (LD) foi composto de 10 g leite em pó desnatado, 0.0194 g glicose, 100 mL de água MilliQ, 100UI de penicilina e 50mg de estreptomicina, com pH 6.8. O diluidor quimicamente definido (QD) foi composto de 0.5g de caseína, 0.007g de cloreto de cálcio, 0.04g de cloreto de potássio, 0.006g de fosfato monopotássico, 0.01g de sulfato de magnésio, 0.0625g de cloreto de sódio, 0.0059g de fosfato dissódico, 0.00875g de bicarbonato de sódio, 0.476g de tampão HEPES, 1.321g de glicose e 3.026g de frutose.

Todos os procedimentos foram realizados após a aprovação pelo Comitê de Ética no Uso dos Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA-UFRPE), licença n° 051/2019 CEUA/UFRPE.

Foram utilizados três bodes sexualmente maduros, os quais foram mantidos em baias individuais, alimentados com feno de capim Tifton, ração comercial peletizada (400 g/dia), além de sal mineral e água *ad libitum*. As colheitas de sêmen foram realizadas pelo método de vagina artificial, na presença de uma fêmea como manequim. Para o Experimento I, foram obtidos cinco ejaculados de cada reprodutor, uma vez por semana, em semanas consecutivas, totalizando 15 ejaculados. Para o Experimento II, foram obtidos quatro ejaculados de cada reprodutor, uma vez por semana, em semanas consecutivas, totalizando 12 ejaculados. Nos dois experimentos, imediatamente após a colheita, os ejaculados foram submetidos às análises microscópicas (turbilhonamento, motilidade e vigor), de forma subjetiva, 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 *pools* que tinham valores mínimos de 70% de motilidade total.

No Experimento **I**, as amostras foram adicionadas aos meios de trabalho (LD = diluidor de leite desnatado; LC0.25 = diluidor de leite desnatado suplementado com 0.25 g/L de caseína; LC0.5 = diluidor de leite desnatado acrescido de 0.5 g/L de caseína), na concentração final de 200×10^6 espermatozoides/mL. No Experimento **II**, as amostras foram adicionadas nos diluidores LD e QD (LD: leite desnatado; QD: diluidor quimicamente definido com 0.5g/L de caseína). Em seguida, todos os procedimentos experimentais foram iguais para os dois experimentos.

As amostras foram armazenadas em tubos falcon (15 mL), devidamente identificados, os quais foram colocados em Becker (600 mL), com aproximadamente 200 mL de água destilada, e levados à geladeira (5 °C). Após um período de estabilização de 2 horas, foi retirada a primeira alíquota de cada grupo experimental para avaliação (0h). A partir dessa hora, foram retiradas alíquotas no período de 24 horas, 48 horas e 72 horas.

Para avaliação de cinética espermática, alíquotas (10 μ L) de sêmen foram diluídas nos respectivos diluidores, para a concentração de 50×10^6 espermatozoide/mL e incubadas em banho-maria (37 °C/15 min). A avaliação foi realizada no sistema CASA. Uma alíquota (3 μ L) da amostra diluída foi colocada sobre 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, %), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %) e índice de oscilação (WOB, %); velocidade curvilínea (VCL, μ m/s), velocidade em linha reta (VSL, μ m/s) e velocidade média da trajetória (VAP, μ m/s). 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 μm^2 ; VAP: lentos 10 $\mu\text{/s}$ <médios 45 $\mu\text{/s}$ <rápidos 75 $\mu\text{/s}$; progressividade, 80% STR; circular, 50% LIN.

Para citometria de fluxo, alíquotas (50 μL) de sêmen de cada grupo experimental foram distribuídas em microtubos (1.5mL), para cada uma das avaliações. Para cada grupo experimental, com exceção do QD – uma vez que não seria necessário já que o diluidor QD não teria componentes que interagiriam com os fluorocromos – foi feita a lavagem para retirada do diluidor, adicionando 1.0mL de PBS. Em seguida, realizou-se a centrifugação (300g/5min), onde o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensão em PBS (40 μL).

Para avaliação da integridade de membrana plasmática (iMPA), as amostras foram coradas com 5 μL de FITC conjugada ao Peanut aglutinin (FITC-PNA; Solução estoque 1 mg/mL em PBS; Solução de trabalho 0.04 mg/mL em PBS) e 5 μL de Iodeto de Propídio (IP; Solução estoque 25 mg/mL em DMSO; Solução de trabalho 0.5 mg/mL em PBS). A amostra foi incubada por 5min em temperatura ambiente e, em seguida, procedeu-se à leitura. Células que apresentam marcação PNA-/IP- foram classificadas como portadoras de membranas acrossomal e plasmática intactas; células com marcação PNA+/IP-, classificadas com membrana acrossomal reagida e plasmática intacta; células com marcação PNA-/IP+, classificadas com membrana acrossomal intacta e plasmática lesionada; e células com marcação PNA+/IP+, classificadas com membranas acrossomal e plasmática lesionadas.

As avaliações do sêmen foram realizadas utilizando-se aparelho ImageStream®X, versão Mark II (Amnis, Seattle, WA, EUA). As aquisições dos dados foram realizadas usando-se o software INSPIRE®, versão 200.1.388.0 (Amnis, Seattle, WA, EUA). Os espermatozoides em foco foram separados mediante histograma do gradiente RMS x frequência normalizada, e as células únicas foram identificadas por meio de um gráfico de pontos da área x relação de aspecto, que foi verificado pelas imagens da galeria do canal campo claro. Todos os fluorocromos foram excitados por um laser de 488nm. Para a associação FITC-PNA+IP, a potência do laser utilizada foi de 55mW, o FITC-PNA foi detectado no canal 2 (505-560nm) e o IP no canal 5 (640-745nm). Em cada uma das amostras, foram adquiridos 5000 eventos. O software IDEAS, versão 6.0 (Amnis, Seattle, WA, EUA), foi utilizado para análise dos dados.

Todas as amostras foram analisadas e as populações divididas por meio de gráficos de pontos e histogramas, além da confirmação visual mediante as imagens das células.

Para a análise dos dados, o software IBM® SPSS® Statistical foi utilizado. Os dados percentuais (IMP, PMM, IAC, MT, MP, LIN, STR e WOB) foram transformados pelo método do arco-seno ($\sqrt{P/100}$) e submetidos à análise de variância (ANOVA, teste F), que separou como causa de variação os efeitos do tratamento, tempo de refrigeração e suas interações (tratamento \times tempo). Para realização da ANOVA foi utilizado o procedimento General Linear Model, com medidas repetidas no tempo. Quando o teste F foi significativo ($P < 0,05$), o *post-test* de Bonferroni foi realizado para comparação das médias ($P < 0,05$). Os dados são expressos como média \pm desvio-padrão dos dados não transformados.

Resultados

Experimento I

Os resultados das análises de cinética espermática estão representados nas Tabelas 1 e 2. Não houve efeito fixo do tempo e tratamento ($p \geq 0,05$) para as variáveis estudadas. Também não houve interação ($p \geq 0,05$) tempo \times tratamento para MP, LIN, STR, WOB. No entanto, houve para MT ($p = 0,025$), VCL ($p = 0,012$), VSL ($p = 0,049$) e VAP ($p = 0,025$) (Tabela 1). Na tabela 2, é possível observar que não houve diferença nos parâmetros cinéticos entre os tratamentos (LD, LC0.25, LC0.5) em nenhum dos tempos avaliados (0h, 24h, 48h, 72h), após refrigeração do sêmen caprino. Ao se avaliar o tempo em cada um dos tratamentos, observa-se que a MT foi menor após 72h de refrigeração no diluidor LD, em comparação a 24h e 48h ($p=0,034$ e $p=0,025$, respectivamente). As análises de VCL, VSL e VAP demonstraram que após 72h, no diluidor LC0.5, houve diferença significativa e os resultados foram menores que em 0h ($p=0,012$, $p=0,049$, $p=0,025$, respectivamente).

Tratando-se da análise de integridade de membrana plasmática e acrossomal (Tabela 1), não se observou efeito de tratamento ou tempo. No entanto, houve interação tratamento \times tempo. Na figura 1A, os resultados apontaram que no tempo 24h, houve diferença significativa entre o diluidor suplementado com caseína na concentração de 0.25g/L e o diluidor sem suplementação. O diluidor LC0.25 apresentou um maior

porcentual de células com membrana plasmática e acrossomal intactas, quando comparado ao diluidor sem adição de caseína ($p=0.013$).

Experimento II

As análises de cinética espermática estão representadas nas Tabelas 3 e 4. Não houve efeito fixo do tempo ou do tratamento, assim como não houve interação do tempo em nenhum dos tratamentos (Tabela 3). Também não houve diferença significativa entre os tratamentos (LD, QD) em nenhum dos tempos avaliados (0h, 24h, 48h, 72h) para os parâmetros MT, MP, VCL, VSL, VAP, STR e WOB. Na Tabela 4, observa-se que o parâmetro LIN foi uma exceção, onde no tempo de 72h, o leite desnatado teve um melhor desempenho em relação ao diluidor QD ($p=0.016$).

Na análise de integridade de membrana plasmática e acrossomal não houve efeito de tempo. No entanto, teve efeito de tratamento com melhor desempenho do diluidor à base de leite desnatado, em relação ao diluidor quimicamente definido ($p=0.008$), dados demonstrados na Tabela 3. Na figura 1B nota-se que houve interação tratamento \times tempo, onde os resultados apontaram que no tempo 48h o diluidor à base de leite desnatado teve maior integridade de membrana plasmática e acrossomal, quando comparado ao diluidor quimicamente definido ($p=0.007$), em 72h o diluidor quimicamente definido manteve-se inferior ($p=0.018$).

Discussão

O diluidor à base de leite é comumente utilizado para criopreservação do sêmen, uma vez que o leite integral contém lipídios e proteínas, e a proteção dos espermatozoides pode ser atribuída às interações lipídeo-lipoproteína-proteína e proteína-proteína. No entanto, tanto o leite integral quanto o leite desnatado protegem igualmente os espermatozoides de touros e carneiros (FOOTE 1978; SALAMON e MAXWELL 2000; MURPHY et al., 2017), indicando que o efeito protetor do leite não é mediado por lipídios, uma vez o leite desnatado passa por um processo de centrifugação onde a gordura do leite é eliminada. Sendo assim, a caseína, principal proteína do leite, está sendo investigada (BERGERON et al., 2007; BERGERON e MANJUNATH, 2006; MANJUNATH et al., 2012) como sendo o componente do leite responsável por proteger os espermatozoides contra as injúrias resultantes da baixa

temperatura de criopreservação. Este é o primeiro artigo a fornecer evidências de que o diluidor quimicamente definido à base de caseína pode ser utilizado para refrigeração de sêmen caprino.

A motilidade espermática vem sendo utilizada como critério primário para avaliar a qualidade do sêmen por diversos autores (SUNDARARAMAN et al., 2012; LOVE et al., 2015; BATTUT et al., 2017). 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. 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 pós-refrigeração. Ressalta-se, então, que os resultados de qualquer diluidor utilizado no presente trabalho ultrapassam a motilidade mínima recomendada pelo CBRA, e, portanto, evidenciam a possibilidade da utilização destes diluidores para refrigeração de sêmen caprino.

Além disso, neste estudo, o padrão de movimento e a cinética espermática não foram afetados pelo processo de refrigeração. O que evidencia a capacidade de proteção da caseína do leite, nos diferentes diluidores utilizados, contra o choque frio causado durante o processo de refrigeração. 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 fosfocolina, 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), 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 o espermatozoide, 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.

A suplementação com caseína ao diluidor à base de leite não preservou a motilidade total e progressiva de espermatozoides submetidos a refrigeração. Assim como, não houve diferença significativa nos outros parâmetros cinéticos. Apesar de a integridade da membrana plasmática e acrossomal ter sido maior ao utilizar 0.25g/L de suplementação de caseína, em comparação ao grupo controle (sem caseína). No diluidor à base de leite, a concentração de caseína é de, aproximadamente, 27g/L (JUAN et al., 2009; DA SILVA et al., 2012), porém, danos ao espermatozoide continuam a ocorrer durante o processo de refrigeração. Esperava-se que a suplementação do diluidor convencional (à base de leite desnatado) com caseína determinasse melhorias significativas nos parâmetros de motilidade, como um suporte maior de proteção aos espermatozoides, corroborando com outros estudos (DELL VALE et al., 2013; MENEZES et al., 2016; ALLAI et al., 2018). No entanto, é possível que a quantidade de caseína adicionada ao diluidor convencional já tenha resultado em estado de saturação, determinando concentração suficiente para todos os efeitos de crioproteção, o que explicaria o motivo da suplementação com caseína não ter causado incremento aos parâmetros espermáticos, ao se utilizar o diluidor à base de leite desnatado.

Conforme a indicação dos resultados, o diluidor quimicamente definido desenvolvido nesse trabalho não trouxe diferença significativa do diluidor do grupo controle (LD), com relação à motilidade espermática (total e progressiva) e parâmetros cinéticos, com exceção da linearidade. O uso de diluidor quimicamente definido para sêmen reduz a variabilidade potencial existente em diluidores à base de leite desnatado ou gema de ovo. O uso de tais diluidores, no entanto, requer que a qualidade espermática durante o armazenamento seja mantida, pelo menos, na mesma qualidade daquele observado com os diluidores já estabelecidos (PARINAUD et al., 1997; BRINSKO et al., 2000; MURPHY et al., 2017). Por conseguinte, o resultado evidencia a possibilidade de utilização deste diluidor para refrigeração de sêmen caprino, como uma alternativa aos diluidores à base de leite desnatado, uma vez que determina resultados cinéticos semelhantes àqueles obtidos com diluidor convencional, à base de leite desnatado.

No entanto, o diluidor quimicamente definido mostrou-se inferior na análise de integridade de membrana plasmática e acrossomal. Esse achado pode estar relacionado à diferença osmótica entre diluidores, uma vez que para proteger os espermatozoides caprinos, o diluidor ideal deve apresentar osmolaridade semelhante àquela encontrada no sêmen (entre 425 e 525 mOsm). Enquanto os diluidores à base de leite desnatado apresentam, em média, 450 mOsm (CONCANNON et al., 1989; PURDY, 2006; MAIA, 2010), o diluidor quimicamente definido apresentou osmolaridade de 397 mOsm. A osmolaridade do diluidor é de grande importância, pois modifica o fluxo de água através da membrana e outros eventos durante a refrigeração (CURRY et al., 1994; 2000; IGUER-OUADA et al., 2001; AISEN et al., 2002; AGCA et al., 2002). De fato, é sabido que existem importantes mudanças osmóticas ao longo do processo de refrigeração, devido ao resfriamento diferencial do meio, produzindo fluxo de água através da membrana celular (IGUER-OUADA et al., 2001; AISEN et al., 2002). A osmolaridade do diluidor pode influenciar não apenas na sobrevivência dos espermatozoides durante a refrigeração, mas também sua resistência à criopreservação (ZENG et al., 2011). Assim, diluidores hiperosmóticos podem favorecer a criopreservação de espermatozoides, não apenas por serem isoosmóticos aos fluidos seminais, mas também porque podem aumentar a desidratação antes do congelamento (COOPER e YEUNG, 2003; MARTINEZ-PASTOR et al., 2005; TAMAYO-CANUL et al., 2011).

A integridade da membrana espermática é um requisito necessário para a criossobrevivência espermática, durante a preservação do sêmen (WATSON et al., 2000). Interessante destacar que, apesar da diferença na integridade da membrana plasmática e acrossomal entre os resultados obtidos com os diluidores, o diluidor quimicamente definido manteve o padrão de motilidade espermática. Assim, mesmo ocorrendo choque osmótico, o que provavelmente acarretou a perda de integridade de membrana plasmática e acrossomal, o diluidor quimicamente definido foi eficiente na preservação dos parâmetros cinéticos dos espermatozoides. Estudos já indicaram que o metabolismo, osmolaridade e função normal do espermatozoide estão relacionados à integridade da membrana plasmática (AISEN et al., 2002; AGCA et al., 2002; TAMAYO-CANUL et al., 2011). Portanto, é possível sugerir que ajustes sejam realizados a esse diluidor, principalmente quanto a osmolaridade, visando promover

melhoria na manutenção da integridade da membrana plasmática e acrossomal dos espermatozoides caprinos, pós-refrigeração.

Unicamente utilizando os resultados apresentados nesse trabalho, não é possível identificar qual componente e/ou característica do diluidor quimicamente definido – caseína, açúcares, compostos químicos, pH ou osmolaridade – desempenha função específica na preservação da qualidade dos espermatozoides. No entanto, pode-se demonstrar que a substituição do leite desnatado por caseína, pelo menos em combinação com os outros componentes do diluidor, não causa redução da qualidade cinética dos espermatozoides submetidos a refrigeração, em comparação ao diluidor à base de leite desnatado. Além disso, os resultados deste estudo estão de acordo com dados anteriores obtidos com sêmen bovino (BATTELIER et al., 1998; 2001) e equino (MARTINS et al., 2016), demonstrando que a caseína pode ser tão efetiva na preservação dos parâmetros de fertilidade de espermatozoides refrigerados quanto os diluidores que contêm leite desnatado.

Conclui-se que a adição de caseína a 0.25g/L, como suplementação ao diluente à base de leite desnatado, preserva a integridade da membrana plasmática e acrossomal de espermatozoides caprinos, submetidos a 24 horas de refrigeração. Além disso, em virtude do diluidor quimicamente definido preservar a cinética de espermatozoides caprinos, após 48 horas de refrigeração, e a integridade de membrana plasmática e acrossomal, até 24 horas de refrigeração, é possível sugerir a realização de mais estudos visando ampliar os benefícios da utilização deste diluidor, em substituição ao diluidor convencional à base de leite desnatado para refrigeração de sêmen caprino.

Declaração de interesses dos autores

Não há interesses concorrentes que tenham sido declarados.

Fonte de financiamento

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), 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.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, M.; BURKE, J.M.; RORIE, R.W.; Effect of Semen Extender and Storage Temperature on Motility of Ram Spermatozoa. **Adv Reprod Sci**, v. 8, p. 14-30, 2020.
- AISEN, 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.
- AISEN, 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.
- ALLAI, L.; BENMOULA, A.; MAIA, M.; NASSER, B.; AMIRI, B.E. Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate, **Anim Reprod Sci**, v. 192, p. 6-17, 2018.
- AURICH C. Recent advances in cooled-semen technology. **Anim Reprod Sci**, v. 107, p. 268-275, 2007.
- BATELLIER, F.; MAGISTRINI, M.; FAUQUANT, J.; PALMER, E. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology** v. 48, p. 391– 417, 1997.
- BATTELIER, F.; VIDAMENT, M.; FALQUANT, J.; DUCHAMP, G.; ARNAUD, G.; YVON J.M.; MAGISTRINI, M. Advances in cooled sêmen technology. **Anim Reprod Sci**, v. 68, p. 181-190, 2001.
- BATTUT, B.; KEMPFER, A.; LEMASSON, N.; CHEVRIER, B.; CAMUGLI, S. 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.; BRINDLE, Y.; BLONDIN, P.; MANJUNATH, P. 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. **Biol Reprod**, v. 77, p. 120-126, 2007.
- BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New Insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Mol Reprod Dev**, v. 73, p. 1338-1344, 2006.
- 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.
- CHANG-HE, L.; HAI-BO, D.; DONG-LI, M.; YOU-WEI, L.; DONG, H.; MING-JIU, L.; ZHONG-LE, C.; JING-HE, T. Effects of pH during liquid storage of goat semen on sperm viability and fertilizing potential. **Anim Reprod Sci**, v. 164, p. 47-56, 2016.

COLAS, G. Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. **J Reprod Fert**, v. 42, p. 277-285. 1975.

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

CONCANNON, P.W.; MCCANN, J.P. Temple, M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **J Reprod Fert Supp**, v. 39, p. 3-25, 1989.

COOPER, T.G.; YEUNG, C.H. Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. **Microsc Res Techn**, v. 60, p. 28-38, 2003.

CURRY, M.R.; MILLAR, J.D.; WATSON, P.F. Calculated optimal cooling rates for ram and human sperm cryopreservation fail to conform with empirical observations. **Biol Reprod**, v. 51, p. 1014-1021, 1994.

DEL VALLE, I.; SOUTER, A.; MAXWELL, W.M.; MUIÑO-BLANCO, T.; CELEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Function of ram spermatozoa frozen in diluents supplemented with casein and vegetable oils. **Anim Reprod Sci**, v. 138, p. 213- 219, 2013.

FICKEL, J.; WAGENER, A.; LUDWIG, A. Semen cryopreservation and the conservation of 247 endangered species. **Eur J Wildl Res**, v. 53, p. 81-89, 2007.

GIL, J; LUNDEHEIM, N; SÖDERQUIST, L.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. **Theriogenology**, v. 59, p. 1241-1255, 2003.

HAFEZ, B. AND HAFEZ, E.S.E. **Reprod Anim**, 7.ed. Barueri: Manole, p. 97-103, 2004.

HOLTZ, W.; FOOTE, R.H. Composition of rabbit semen and the origin of several constituents. **Bio Reprod**, v. 18, p. 286-292, 1978.

IGBOKWE, A.A.; IYASERE, O.S.; SOBAYO, R.A.; IYASERE, S.; ANIMASHAUN, R.I.; BALOGUN, F.A.; AGANRAN, Z.O.; FASOLA, M.O.; ADEDOKUN, A.D.; LAKEHINDE, O.A.; LASISI, S.O.; SULEIMAN M.R.; IYIOLA, J.D.; DARAMOLA, J.O.; Comparative effect of slow and rapid freezing on sperm functional attributes and oxidative stress parameters of goat spermatozoa cryopreserved with tiger nut milk extender. **Reprod Domest Anim**, v. 54, p. 551-559, 2019.

IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J.P. Evaluation of the Hamilton-Thorn computer-based automated system for dog semen analysis. **Theriogenology**, v. 55, p. 733-749, 2001.

- LAGARES M.A.; MARTINS H.S.; CARVALHO I.A.; OLIVEIRA JUNIOR C.A.; SOUZA M.R.; PENNA C.F.A.M.; CRUZ B.C.; HENRY M.R.J.M. Casein protects stallion sperm during semen cooling and freezing. **Cryo Lett**, v. 33, p. 213–218, 2012.
- LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Anim Reprod Sci**, v. 62, p. 113–141, 2000.
- LOVE, C.C.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; BRINSKO, S.P.; VOGEL, J.; BLISS, S.; SUDDERTH, K.; TEAGUE, S.; LaCAZE, K. Effect of daily semen centrifugation and resuspension on the longevity of equine sperm quality following cooled storage. **Theriogenology**, v. 77, p. 1911-1917, 2015.
- LUSIGNAN, M.F.; BERGERON, A.; LAFLEUR, M.; MANJUNATH, P. The major proteins of bovine seminal plasma interact with caseins and whey proteins of milk extender. **Bio of Reprod**, v. 85, p. 457-464, 2011.
- MAHÉ, S.; MESSING, B.; THUILLIER, F.; TOMÉ, D. Digestion of bovine milk proteins in patients with a high jejunostomy. **Am J Cli Nutri**, v. 54, p. 534-8, 1991.
- MAIA, K.M.; PEIXOTO, G.C.X.; CAMPOS, L.B.; BEZERRA, J.A.B.; RICARTE, A.R.F.; MOREIRA, N.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. Estrus cycle monitoring of captive collared peccaries (*Pecari tajacu*) in semiarid conditions. **Pesq Vet Bras**, v. 34, p. 1115-1120, 2014a.
- MAIA, K.M.; PEIXOTO, G.C.X.; CAMPOS, L.B.; SILVA, A.M.; CASTELO, T.S.; RICARTE, A.R.F.; SILVA, A.R. Estrous Synchronization in Captive Collared Peccaries (*Pecari tajacu*) using a Prostaglandin F2 α Analog. **Zool Soc**, v. 31, p. 836-839, 2014b.
- MANJUNATH P. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. **Anim Reprod**, v. 9, n. 4, p. 809-815, 2012.
- MARTINEZ-PASTOR, F. C.; GUERRA, C.; KAABIB, M.; DIAZA, A.R.; ANELB, A.; HERRAEZA, P.; DE PAZA, P.; ANEL, L. Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time. **Theriogenology**, v. 60, p. 24-40, 2005.
- 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.
- MENEZES, T.A.; MELLAGI, A.P.G.; OBERRATHER, K.; FIÚZA, A.T.L.; PASCHOAL, A.F.L.; SANTOS, J.T.; BERNARDI, M.L.; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F.P. Qualidade de doses de sêmen suíno armazenadas à 17 °C sem período prévio de estabilização em temperatura ambiente. **Anais Porkexpo**. Foz do Iguaçu, Brasil. 2016.

MURPHY, E. M.; MURPHY, C.; O'MEARA, C.; DUNNE, G.; EIVERS, B.; LONERGAN, P.; FAIR, S. A comparison of semen diluents on the in vitro and in vivo fertility of liquid bull semen. **J Dairy Sci**, v. 100, p. 1541–1554, 2017.

ORTEGA, A.M.; IZQUIERDO, A.C.; GÓMEZ, J.J.H.; CORICHI, I.M.O.; TORRES, V.M.M.; MÉNDEZ, J.J.V. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen: una revisión. **Interciencia**, v. 28, p. 699-704, 2003.

PAGL, R.; AURICH, C.; KANKOFER, M. Anti-oxidative status and semen quality during cooled storage in stallions. **J Vet Med**, v. 53, p. 486-489 2006.

PARINAUD, J.; Le LANNOU, D.; VIELTEZ, G.; GRIVEAU, J.F.; MILHET, P.; RICHAILLEY, G. Enhancement of motility by treating spermatozoa with an antioxidant solution (Sperm-Fit©) following ejaculation. **Hum Reprod**, v. 12, p. 243 - 246, 1997.

PLANTE, G.; LUSIGNAN, M. F.; LAFLEUR, M.; MANJUNATH, P. Interaction of milk proteins and Binder of Sperm (BSP) proteins from boar, stallion and ram semen. **Reprod Biol Endoc**, v. 92, p. 1-13, 2015.

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

RAJABI-TOUSTANI R.; MOTAMEDI-MOJDEHI R.; ROOSTAEI-ALI MEHR M. Effect of Different Levels of Glycerol and Cholesterol-Loaded Cyclodextrin on Cryosurvival of Ram Spermatozoa. **Reprod Dom Ani**, v. 49, p. 65-70, 2014.

SALAMON S.; MAXWELL W.M.C. Storage of ram semen. **Anim Reprod Sci**, v. 62, p. 77–111, 2000.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen Storage of Ram Semen I. Processing, Freezing, Thawing and Fertility after Cervical Insemination. **Anim Reprod Sci**, v. 34, p. 185-249, 1995.

SILVA, L.C.C.; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; YAMADA, A.K.; GIOMBELLI, C.J.; SILVA, M.R. Estabilidade térmica da caseína e estabilidade ao álcool 68, 72, 75 e 78%, em leite bovino. **Rev Inst Lat**, v. 67, p. 55-60, 2012.

STORNELLI, M. C.; TITTARELLI, C. M.; SAVIGNONE, C. A.; STORNELLI, M. A. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. **Ana Vet**, v. 25, n. 2, p. 28-35, 2005.

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

TAMAYO-CANULA J.; ALVAREZA M.E.; LÓPEZ-URUEÑA A.; NICOLASA M.; MARTINEZ-PASTORA F.; ANELA E.; ANELA L.; PAZ P. Undiluted or extended

storage of ram epididymal spermatozoa as alternatives to refrigerating the whole epididymes. **Anim Reprod Sci**, v. 126, p.76-82, 2011.

TASSERON, F.; AMIR, D.; SCHINDLER, H. Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing. **J Reprod Fert**, v. 51, p. 461-462, 1977.

VASQUEZ, J. H.; NUNEZ, V. H.; FLORENTINI, E. A.; GONZALES, J. M.; CAMARGO, L. A.; VALDIVIA, M. E. Effects of five cryoprotective agents on quality of sheep epididymal spermatozoa during pre-freezing. **Liv Sci**, v. 152, p. 94-99, 2013.

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

ZENG, X.H.; YANG, C.; KIM, S.T.; LINGLE, C.J.; XIA, X.M. Deletion of the Slo3 gene abolishes alkalization-activated K⁺ current in mouse spermatozoa. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 108, p. 5879–5884, 2011.

LEGENDAS DAS FIGURAS E TABELAS

Tabela 1. Valores de probabilidade para os efeitos da caseína em diferentes concentrações (0, 0.25 ou 0.50g/L; Experimento I), adicionada ao diluidor à base de leite desnatado, do tempo (0, 24, 48 e 72 horas) e suas interações nos parâmetros das análises da cinética (CASA) e da integridade de membrana plasmática e acrossomal (citometria de fluxo) de espermatozoides caprinos, pós-refrigeração.

Tabela 2. Parâmetros cinéticos (CASA) de espermatozoides caprinos refrigerados em diluidor à base de leite desnatado, suplementado ou não com caseína (Experimento I). Dados demonstrados como média e desvio padrão.

Tabela 3. Valores de probabilidade para os efeitos do diluidor à base de leite desnatado ou quimicamente definido (Experimento II), do tempo (0, 24, 48 e 72 horas) e suas interações nos parâmetros das análises da cinética (CASA) e da integridade de membrana plasmática e acrossomal (citometria de fluxo) de espermatozoides caprinos, pós-refrigeração.

Tabela 4. Parâmetros cinéticos (CASA) de espermatozoide caprinos refrigerados em diluidor à base de leite desnatado ou quimicamente definido (Experimento II). Dados demonstrados como média e desvio padrão.

Figura 2. Integridade de membrana plasmática e acrossomal de espermatozoides caprinos, submetidos a refrigeração (5 °C) em diferentes diluidores, avaliados nos tempos 0h, 24h, 48h e 72h, por citometria de fluxo; Dados expressos como média e desvio-padrão. **A)** Experimento I – Leite desnatado (LD); Leite desnatado suplementado com 0.25g/L de caseína (LC0.25); Leite desnatado suplementado com 0.5g/L de caseína (LC0.5); **B)** Experimento II – Leite desnatado (LD) ou diluidor quimicamente definido (QD).

FIGURAS E TABELAS

Tabela 1

Parâmetro	Concentração	Tempo	Interação
MT	0.584	0.103	0.025
MP	1.000	0.187	0.099
VCL	1.000	0.093	0.012
VSL	1.000	0.087	0.049
VAP	1.000	0.080	0.025
LIN	0.674	0.229	0.199
STR	0.367	0.593	0.433
WOB	1.000	0.061	0.175
PNA/IP	1.000	0.135	0.013

MT = motilidade total; MP = motilidade progressiva; VCL = velocidade curvilínea; VSL = velocidade em linha reta; VAP = velocidade média da trajetória; LIN = linearidade; STR = retilinearidade; WOB = índice de oscilação; PNA/IP = integridade de membrana plasmática e acrossomal.

Tabela 2

Parâmetro	Tempo de Avaliação	Tratamentos		
		LD	LC0.25	LC0.5
MT	0h	80.46±10.67 ^{ab}	85.90±4.73	80.24±8.99
	24h	88.12±2.84 ^a	81.80±4.46	79.06±6.98
	48h	75.82±6.55 ^a	71.46±7.89	70.42±6.99
	72h	50.80±17.31 ^b	46.84±23.15	47.36±18.8
MP	0h	30.70±12.18	38.28±9.62	36.90±9.47
	24h	34.70±5.26	32.02±7.19	31.78±11.03
	48h	27.60±11.48	34.26±11.78	31.72±9.62
	72h	17.02±12.74	18.44±17.39	15.35±10.96
VCL	0h	95.19±6.99	91.54±6.27 ^a	96.33±10.26
	24h	92.01±8.48	80.46±5.92 ^{ab}	84.83±14.87
	48h	71.26±16.01	80.32±16.12 ^{ab}	82.02±8.45
	72h	72.82±15.33	70.44±21.12 ^b	61.44±9.51
VSL	0h	56.21±11.27	57.15±7.71 ^a	64.41±12.77
	24h	53.08±6.82	46.87±7.62 ^{ab}	51.12±19.56
	48h	40.49±13.78	51.76±13.42 ^{ab}	50.92±4.85
	72h	44.55±13.82	43.61±19.46 ^b	34.49±9.06
VAP	0h	73.74±8.76	72.05±7.38 ^a	79.18±11.57
	24h	69.63±8.08	59.70±7.13 ^{ab}	64.24±18.26
	48h	50.84±15.9	62.87±14.37 ^{ab}	63.11±6.96
	72h	54.45±14.09	52.27±21.34 ^b	43.53±10.42
LIN	0h	58.65±7.89	62.24±4.93	66.37±7.59
	24h	57.66±5.07	57.97±6.28	58.69±11.42
	48h	55.64±8.94	63.87±4.28	62.29±5.78
	72h	60.33±7.57	59.43±12.13	55.44±6.99
STR	0h	75.64±6.16	79.17±4.81	80.81±5.86
	24h	76.21±3.70	78.16±4.76	78.03±7.06
	48h	79.16±5.32	81.88±3.90	80.89±5.51
	72h	81.04±5.46	81.91±6.01	78.86±2.53
WOB	0h	77.3±4.34	78.58±3.12	81.94±4.05
	24h	75.57±3.41	74.00±4.23	74.68±7.76
	48h	70.10±8.10	77.95±2.51	76.92±2.58
	72h	74.22±4.48	72.03±10.00	70.13±6.84

MT = motilidade total; MP = motilidade progressiva; VCL = velocidade curvilínea; VSL = velocidade em linha reta; VAP = velocidade média da trajetória; LIN = linearidade; STR = retilinearidade; WOB= índice de oscilação;

Tabela 3

Parâmetro	Concentração	Tempo	Interação
MT	0.560	0.093	0.057
MP	0.335	0.223	0.054
VCL	0.469	0.058	0.079
VSL	0.467	0.366	0.104
VAP	0.204	0.274	0.077
LIN	0.132	1.000	0.016
STR	0.466	1.000	0.056
WOB	0.075	0.173	0.068
PNA	0.008	0.099	0.007

MT = motilidade total; MP = motilidade progressiva; VCL = velocidade curvilínea; VSL = velocidade em linha reta; VAP = velocidade média da trajetória; LIN = linearidade; STR = retilinearidade; WOB = índice de oscilação; PNA/IP = integridade de membrana plasmática e acrossomal.

Tabela 4

Parâmetro	Tempo de Avaliação	Grupos Experimentais	
		Leite Desnatado	Quimicamente Definido
MT	0h	83.80±8.81	81.23±3.67
	24h	87.45±2.78	78.33±4.16
	48h	73.43±4.35	63.38±13.46
	72h	42.70±25.16	51.42±23.63
MP	0h	29.90±13.91	29.68±9.99
	24h	35.01±6.02	29.85±14.53
	48h	26.28±12.8	18.88±14.84
	72h	17.25±11.41	12.54±7.43
VCL	0h	93.57±6.90	78.84±15.72
	24h	91.41±9.66	74.60±10.89
	48h	66.08±12.76	68.32±15.89
	72h	69.07±14.82	64.90±28.65
VSL	0h	52.34±8.32	42.60±8.33
	24h	53.54±7.78	42.24±16.40
	48h	37.43±13.81	33.57±13.20
	72h	42.69±15.22	43.36±28.41
VAP	0h	70.72±6.45	54.48±10.00
	24h	69.81±9.31	53.35±15.13
	48h	46.44±14.42	44.03±15.58
	72h	51.91±14.9	39.44±17.45
LIN	0h	55.68±4.92	54.11±4.18
	24h	58.50±5.43	55.37±14.09
	48h	55.23±10.27	48.45±10.75
	72h	60.62±8.71 ^a	47.19±9.76 ^b
STR	0h	73.65±4.91	78.02±3.8
	24h	76.68±4.10	77.46±8.02
	48h	79.69±5.98	75.72±3.81
	72h	81.19±6.29	75.2±4.43
WOB	0h	75.52±2.01	69.28±2.26
	24h	76.2±3.57	70.67±11.02
	48h	69.02±8.93	63.66±11.15
	72h	74.39±5.16	62.47±10.28

MT = motilidade total; MP = motilidade progressiva; VCL = velocidade curvilínea; VSL = velocidade em linha reta; VAP = velocidade média da trajetória; LIN = linearidade; STR = retilinearidade; WOB = índice de oscilação;

Figura 2

