



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**EFEITO DA PROTEÍNA ANTICONGELANTE SOBRE OS ESPERMATOZOIDES  
CAPRINOS CRIOPRESERVADOS**

**MILLENA MARIA MONTEIRO**

**RECIFE – PE**

**2021**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**EFEITO DA PROTEÍNA ANTICONGELANTE SOBRE A QUALIDADE DOS  
ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS DE CAPRINOS**

**MILLENA MARIA MONTEIRO**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biociência Animal, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biociência Animal.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Madalena Pessoa Guerra

**Co-orientadora:** Sildivane Valcácia Silva

**RECIFE – PE**

**2021**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**EFEITO DA PROTEÍNA ANTICONGELANTE SOBRE A QUALIDADE DOS  
ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS DE CAPRINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal, 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 as normas de ética científica.

**Tese elaborada por:**  
MILLENA MARIA MONTEIRO  
Aprovada em 20 de dezembro de 2021

**BANCA EXAMINADORA**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Madalena Pessoa Guerra / DMV-UFRPE

---

Coorientadora/ membro suplente: Sildivane Valcácia Silva (UFPB)

---

Membro titular: Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro (UFRPE)

---

Membro titular: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ellen Cordeiro Bento da Silva (UFRPE)

---

Membro titular: Profa Dra Andreia Fernandes de Souza (UFRPE)

---

Membro titular: Prof. Dr. Diogo Ribeiro Câmara (UFAL)

---

Membro suplente: Dra. Lucia Cristina Pereira de Arruda (UFRPE)

---

## FICHA CATALOGRÁFICA

Tese à disposição na Biblioteca Central da Universidade Federal Rural de Pernambuco. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às normas de ética científica.

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)

---

M775e MONTEIRO, MILLENA MARIA  
EFEITO DA PROTEÍNA ANTICONGELANTE SOBRE OS ESPERMATOZOIDES CAPRINOS  
CRIOPRESERVADOS / MILLENA MARIA MONTEIRO. - 2021.  
76 f. : il.

Orientadora: MARIA MADALENA PESSOA GUERRA.  
Coorientadora: SILDIVANE VALCACIA SILVA.  
Inclui referências.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em  
Bióciência Animal, Recife, 2022.

1. CRIOPRESERVAÇÃO. 2. SEMEN. 3. PROTEÍNA ANTICONGELANTE. 4. MICROSCOPIA  
ELETRONICA DE VARREDURA. 5. BODE. I. GUERRA, MARIA MADALENA PESSOA, orient. II. SILVA,  
SILDIVANE VALCACIA, coorient. III. Título

---

CDD 636.089

Eu dedico esse trabalho a Deus, por iluminar sempre a minha vida.

Ao meu filho e meu marido, pelo amor, compreensão e apoio.

Aos meus pais, minha irmã e sobrinhos, pelo incentivo e carinho.

Dedico com todo meu amor!

## **AGRADECIMENTOS**

Jamais conseguirei expressar em palavras a importância que cada um tem em minha vida.

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem a fé que Nele deposito, eu nada seria. E à espiritualidade amiga que também me mantém de pé nas dificuldades da vida.

Aos meus pais, Célia e Walter, que sempre me motivaram, com muito amor, a nunca desistir e me deram todas as oportunidades e ferramentas para conquistar tudo o que hoje tenho.

À minha irmã, Marília, e meus sobrinhos, Marquinho e Artur, por todo amor e carinho.

Ao meu marido, Sérgio, por toda paciência. E, principalmente, meu filho, Lucca que será o meu maior incentivo para toda vida.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Madalena Guerra, pela oportunidade, compreensão, confiança e palavra amiga nos momentos necessários e mais difíceis desse processo. Obrigada por sempre acreditar em mim.

Ao meu eterno professor e amigo, André Mariano Batista, que mesmo mais distante nos últimos meses, palavras nunca serão suficientes para expressar minha gratidão. Muito obrigada por tudo!

À minha coorientadora Profa Sildivane Valcácia Silva, que sempre teve toda minha admiração, obrigada por ter sido tão paciente sempre.

A toda família AndroLab (Pierre, Desirée, Jerônimo, Lucinha, Aline, Thalles, Mergulhão), por todo apoio, ensinamentos e amizade. Sem meus amigos, nada faria sentido.

Agradeço a todos de coração, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho!

**“Mesmo quando tudo parece desabar,  
cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar;  
porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o  
decidir”**

**(Cora Coralina)**

## RESUMO

Este estudo teve por objetivo investigar o efeito da proteína anticongelante do tipo III, adicionada ao diluidor de criopreservação de espermatozoide caprino, sobre a viabilidade espermática pós-descongelação. No primeiro experimento, 16 pares de testículos e epidídimos foram obtidos em abatedouro, e transportados a, aproximadamente, 5 °C em caixa térmica em torno de 10 horas, até o recebimento e processamento do mesmo. Os espermatozoides foram recuperados e avaliados em microscópio de contraste de fase. Congelados em diluidor à base de Tris-gema de ovo, suplementado com proteína anticongelante tipo III – PAC III (0; 1; 10; 100 µg/mL), utilizando o sistema automatizado. Após descongelação (37 °C/30 seg), foram avaliadas cinética espermática, pelo sistema automatizado CASA, integridade de membrana plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e produção intracelular de ROS, por citometria de fluxo. Não houve diferença ( $P \geq 0,05$ ) entre os grupos experimentais para os parâmetros de cinética espermática, potencial de membrana mitocondrial e produção de ROS. A integridade de membrana plasmática e acrossomal de espermatozoides congelados com 100 µg/mL de PAC III foi inferior ( $P < 0,05$ ) ao grupo controle. O segundo experimento foi dividido em duas partes, onde foi investigado o efeito da PAC III em diluidor à base de Tris-gema de ovo (Experimento I) e Leite desnatado (Experimento II). O sêmen de quatro bodes Saanen (6 repetições) foi utilizado para formação do *pool* e testado nos Diluentes Tris-gema de ovo (Experimento I) ou Leite desnatado (Experimento II), ambos suplementados com concentrações da PAC III (0; 1; 10; 100 µg/mL). Após a diluição ( $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL), as amostras foram envasadas em palhetas (0,25 mL) e congeladas (-196 °C). Para cada grupo, duas palhetas foram descongeladas (37 °C por 30 s) e agrupadas para análise *in vitro* da cinética espermática (CASA) e da integridade de membrana plasmática e de acrossoma (microscopia de epifluorescência). Duas palhetas foram descongeladas para análise ultraestrutural dos espermatozoides por microscopia eletrônica de varredura. Não houve diferença ( $P \geq 0,05$ ) entre os grupos experimentais dos dois Experimentos para os parâmetros de cinética espermática, integridade de membrana plasmática e acrossomal. Os resultados da avaliação ultraestrutural mostraram que independente do diluidor utilizado, a PAC III danificou a membrana plasmática das células espermáticas. Baseado nos resultados do presente estudo, conclui-se que a adição da PAC III ao diluidor Tris-gema de ovo não favorece a criopreservação de espermatozoides epididimários caprinos, além disso, quando em alta concentração (100 µg/mL) compromete a integridade de membrana plasmática e acrossomal dessas células. Ainda, que a PAC III, nas concentrações utilizadas, em diluidor à base de Tris-gema de ovo ou leite desnatado, não preserva a qualidade seminal de espermatozoides ejaculados caprinos.

**Palavras-chave:** *Criopreservação; bode; citometro de fluxo; cinética espermática; cristais de gelo.*



## ABSTRACT

This study aimed to investigate the effect of antifreeze protein type III (AFP III) added to cryopreservation extender of goat sperm on post-thawing sperm viability, with the objective of improving semen cryopreservation protocols. In the first experiment, 16 testicular pairs were collected in a slaughterhouse and transported at approximately 5 °C in a thermal box around 10 hours, until processing in the laboratory. Epididymis spermatozoa were recovered by washing and evaluated with phase contrast microscope. Then cryopreserved in Egg Yolk based extender, supplemented with antifreeze protein type III (0; 1; 10; 100 µg/mL), using automated system. After thawing (37 °C /30 sec), spermatic kinetics were evaluated by CASA automated system, acrosome plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and intracellular ROS production by flow cytometry. No difference ( $P \geq 0.05$ ) was seen between the experimental groups for the parameters of spermatic kinetics, mitochondrial membrane potential and ROS production. However, the integrity of plasma membrane and acrosome of frozen sperm with 100 µg/mL of AFP III was lower ( $P < 0.05$ ) when compared to control group. The addition of AFP III to tris-egg yolk extender, used in the freezing of sperm obtained from the epididymis of goats, does not favor preservation of goat sperm recovered from epididymis. In addition, when at high concentration (100 µg/mL) it compromises the integrity of the plasma and acrosome membrane of these cells. The second experiment was divided into two parts: Experiment I and II, where the effect of AFP III on extenders based on Tris- egg yolk and skimmed milk was investigated, respectively. The semen of four Saanen goats (6 replicates) was used for pool formation and used in Egg Tris-yolk Diluent (Experiment I) and Skim Milk Based Diluent (Experiment II), both supplemented with AFP III concentrations, obtaining the following sample groups: 0; 1; 10; 100 µg/mL. After dilution ( $200 \times 10^6$  sperm/mL), the samples were filled in 0.25 mL straws and frozen (-196 °C). For each group, two straws were thawed (37 °C for 30 s) and grouped for in vitro analysis of spermatic kinetics, through CASA; and plasma membrane integrity (IMP) and acrosome integrity (IAC) by epifluorescence microscopy. Two straws were thawed for ultrastructural analysis of spermatozoa by scanning electron microscopy. No difference ( $P \geq 0.05$ ) was seen between experimental groups from the two experiments for the parameters of kinetics, plasma membrane integrity and acrosome. Except for the progressive motility that the concentration of 1 and 100 µg/mL differed ( $P < 0.05$ ) from each other when skim milk Based Diluent was used. The results of the ultrastructural evaluation showed that regardless the diluent used, AFP III damaged the plasma membrane of the spermatic cells in a dose-dependent manner. Based on the results of the present study, it is concluded that AFP III in the concentrations used, in extenders based on egg tris-yolk and skimmed milk, does not improve seminal quality.

**Keywords:** *Cryopreservation; goat; flow cytometer; spermatic kinetics; ice crystals.*

## SUMÁRIO

	Página
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	14
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	16
2.1 Sêmen.....	16
2.2 Espermatozoides epididimários.....	16
2.3 Diluidor de sêmen.....	18
2.3.1 Diluidor à Base de Leite desnatado.....	19
2.3.2 Diluidor à base de Tris-gema de ovo.....	19
<b>2.4 Criopreservação de Sêmen .....</b>	20
<b>2.5 Proteína anticongelante .....</b>	22
<b>2.6 Métodos de Avaliação Espermática.....</b>	23
2.6.1 Sistema Automático de Análise Espermática (CASA).....	23
2.6.2 Análise por Epifluorescência.....	25
2.6.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	27
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	29
<b>4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	30
<b>5 ARTIGOS.....</b>	38
5.1 Artigo 1.....	38
5.2 Artigo 2.....	56
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	76

## LISTA DE FIGURAS

		Página
<b>Figura 1</b>	Espermatozoides caprinos, após congelação em diluidore Tris-gema de ovo, adicionado de diferentes concentrações de PAC III, obtidas em microscópio eletrônico de varredura.....	65
<b>Figura 2</b>	Espermatozoides caprinos, após congelação em diluidor Leite Desnatado, adicionado de diferentes concentrações de PAC III, obtidas em microscópio eletrônico de varredura.....	68

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1</b> Cinemática (CASA) de sêmen criopreservado de bodes em diluidor acrescido com diferentes concentrações de PAC III. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão.....	45
<b>Tabela 2</b> Integridade de membrana plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, níveis de ROS intracelular (citometria de fluxo) de sêmen criopreservado de bodes, em diluidor acrescido com diferentes concentrações de PAC III. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão.....	46
<b>Tabela 1</b> Valores médios dos parâmetros cinéticos de espermatozoides caprinos, após congelação em diluidor à base de Tris-Gema de ovo, adicionado de diferentes concentrações (0, 1, 10 e 100 $\mu\text{g/ml}$ ) de PAC III.....	63
<b>Tabela 2</b> Percentuais de espermatozoides caprinos portadores de membrana plasmática (iMP) e membrana acrossomal (iAC) integras, após congelação em diluidor à base de Tris-gema de ovo, adicionado de diferentes concentrações (0,1, 10 e 100 $\mu\text{g/ml}$ ) de PAC III e avaliados em microscopia de epifluorescência.....	63
<b>Tabela 3</b> Valores médios dos parâmetros cinéticos de espermatozoides caprinos, após congelação em diluente à base de Leite desnatado, adicionado de diferentes concentrações (0, 1, 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$ ) de PAC III. ....	66
<b>Tabela 4</b> Percentuais de espermatozoides caprinos portadores de membrana plasmática (iMP) e membrana acrossomal (iAC) integras, após congelação em diluente à base de leite desnatado, adicionado de diferentes concentrações (0, 1, 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$ ) de PAC III e avaliados em microscopia de epifluorescência. ....	67

## ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

- ALH – amplitude do deslocamento lateral de cabeça
- BCF – frequência do batimento flagelar cruzado
- CASA – análise de sêmen assistida por computador
- DCF – diacetato de carboxifluoresceína
- FITC-PNA – isotiocianato de fluoresceína conjugado a Peanut aglutinina
- IAC – integridade de acrossoma
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IMP – integridade de membrana plasmática
- JC-1 – iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarbocianina
- LDL – lipoproteínas de baixa densidade
- LIN – linearidade
- MEV – microscopia eletrônica de varredura
- MP – motilidade progressiva
- MT – motilidade total
- PAC – proteína anticongelante
- PACs – proteínas anticongelantes
- PMM – potencial de membrana mitocondrial
- ROS – espécies reativas ao oxigênio
- STR – retilinearidade
- VAP – velocidade média do percurso
- VCL – velocidade curvilínea
- VSL – velocidade em linha reta
- WOB – índice de oscilação

## 1 INTRODUÇÃO

A caprinocultura é uma atividade econômica de notória importância mundial e apresenta grande potencial de crescimento no Brasil, devido à capacidade de adaptação desses animais frente às condições climáticas adversas (XIMENES, 2012). Dentre vários aspectos, a exploração de caprinos na região Nordeste destaca-se pelo seu efetivo, onde 94,6% do rebanho nacional são explorados nessa região (IBGE, 2019). Por esta razão, é fundamental a implantação de biotécnicas reprodutivas para otimizar e melhorar as condições deste agronegócio (BICUDO et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2013).

A criopreservação é uma biotécnica que permite a conservação do sêmen por tempo indeterminado, possibilitando a rápida difusão de material genético superior (SALAMON; MAXWELL, 2000; LV et al., 2018). No entanto, a conservação pelo frio é um evento estressante para o espermatozoide e pode gerar danos estruturais e funcionais que podem comprometer a viabilidade celular (PURDY, 2006; SEIFI-JAMADI et al., 2017). Sugere-se que a formação de cristais de gelo tem grande importância sobre esses danos, pois submete as células a condições anisomóticas, que causam alterações do volume celular, e desequilíbrio oxidativo (HOLT, 2003; ROBLES et al., 2019).

Buscando minimizar os danos decorrentes da criopreservação, diversas pesquisas estão focadas na modificação dos diluidores, através da utilização de compostos que atuam diretamente sobre a célula espermática, como fontes lipídicas (VIDAL et al., 2013) e/ou crioprotetores penetrantes (BEZERRA et al., 2011; ARAUJO SILVA et al., 2019). No entanto, pouco se tem pesquisado sobre substâncias que atuem também na matriz extracelular, minimizando os efeitos deletérios decorrentes da formação, dissolução e recristalização dos cristais de gelo, como a utilização de proteínas e glicoproteínas anti-congelantes (PACs e GPAC) (PROVESI; AMANTE, 2015).

As PACs e GPAC são uma classe de polipeptídeos produzidas por peixes, fungos, algumas espécies de insetos e plantas, com capacidade de modificar o crescimento normal do gelo (YANG et al., 1988), a recristalização (KNIGHT, 1984) e agir como protetores da membrana plasmática em baixas temperaturas (RUBINSKY

et al., 1991). São conhecidos cinco membros que compõem a família das proteínas anti-congelantes (PACI, PACII, PACIII, PACIV e GPAC), mas apenas três estão disponíveis comercialmente (PACI, PACIII e GPAC). A suplementação dos diluidores de sêmen com as PACs e GPAC tem sido realizada, mas os resultados variam de acordo com a espécie (YOUNIS et al., 1998; QADEER et al., 2014; ZILLI et al., 2014; CORREIA et al., 2021; LV et al., 2021).

Melhores resultados pós-descongelamento foram obtidos para motilidade espermática de ovinos (PAYNE; OLIVER; UPRETI, 1994; CORREIA et al., 2021), caprinos (LV et al., 2021) e coelhos (NISHIJIMA et al., 2014), motilidade e integridade da membrana plasmática dos espermatozoides dos chimpanzés (YOUNIS et al., 1998) e búfalos (QADEER et al., 2014), resistência osmótica da célula espermática de bovinos (PRATHALINGAM et al., 2006), e linearidade, velocidade linear progressiva e integridade de membrana do sêmen de peixes (BEIRÃO et al., 2012). Todavia, a adição das proteínas anticongelantes foi deletéria à taxa de sobrevivência espermática de ratos (KOSHIMOTO et al., 2002).

Devido a esses dados conflitantes e à ausência de estudos relatando os efeitos da adição destas proteínas ao sêmen da espécie caprina, bem como das evidências que sugerem de que as proteínas e glicoproteínas anticongelantes exerçam papel na proteção dos espermatozoides, seu real mecanismo precisa ser elucidado. Por conseguinte, propõe-se, com este estudo, avaliar o efeito da PAC III sobre o sêmen criopreservado de caprino, por meio de sua avaliação funcional pós-descongelamento.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Sêmen**

O sêmen é uma suspensão celular líquida, composta por espermatozoides, secreção dos órgãos acessórios do trato genital masculino (HAFEZ; HAFEZ, 2004), composto de substâncias orgânicas, como frutose, proteínas, fosfolípidios, ácido cítrico e prostaglandinas (QUEIROS, 2018). Os gametas masculinos são produzidos nos testículos e, posteriormente, maturados no epidídimo (CUNNINGAH; KLEIN, 2008).

A ejaculação é formada pela porção fluida e espermatozoides dessa suspensão, chamada de plasma seminal, que possui características próprias em cada espécie e é capaz de proporcionar condições ótimas de sobrevivência, manutenção e transporte espermático no sistema reprodutor animal (SOUZA et al., 2009). A quantidade e qualidade do sêmen varia em decorrência de diversos fatores, como raça, variação de luminosidade diária, temperatura do ambiente e, principalmente, fotoperíodo (PAULA et al., 2008; GUASTI et al., 2012).

O sêmen caprino pode ser usado tanto fresco, seja puro ou diluído, quanto refrigerado ou congelado, sendo o fresco e o refrigerado os que apresentam maior taxa de fertilidade, embora haja restrição de utilização apenas no período sexual dos machos. Enquanto o sêmen criopreservado pode ser aproveitado por longos períodos de tempo (CASTELO et al., 2008). No entanto, possui algumas particularidades, como a presença da glicoproteína SUB-III, identificada na secreção da glândula bulbouretral, que induz uma reação acrossomal capaz de prejudicar a sobrevivência dos espermatozoides (CHUNRONG et al., 2019), além das enzimas coaguladoras da gema do ovo (EYCE) (SILVA, 2015).

### **2.2 Espermatozoides epididimários**

O trato genital de caprinos é formado por testículos, epidídimos, escroto, canais deferentes, glândulas anexas, uretra, pênis e prepúcio. O epidídimo possui três regiões distintas, sendo elas cabeça, corpo e cauda (CAMPOS, 2003), as quais são responsáveis pela reabsorção, maturação espermática e armazenamento de espermatozoides férteis, respectivamente (ROCHA, 2012). A colheita de



espermatozoides diretamente da cauda do epidídimo mostra-se como uma alternativa para os casos em que não há a possibilidade de obtenção de gametas por meio da ejaculação, e necessita de preservação (BERTOL et al., 2014).

A aquisição de material seminal diretamente do epidídimo não é completamente elucidada no que diz respeito à motilidade e capacidade fecundante, mas estudos sugerem que essas células, quando colhidas diretamente da cauda do epidídimo, apresentam uma maior taxa de fertilização quando comparadas àquelas obtidas da cabeça ou corpo (MONTEIRO, 2013).

Rocha (2012) relatou que existe diferença na membrana dos espermatozoides epididimários daqueles obtidos do ejaculado, devido à influência do plasma seminal, uma vez que o plasma também é composto por secreções das glândulas anexas, o que eleva a variabilidade de componentes bioquímicos, acarretando aumento ou diminuição da fertilidade. Santiago-Moreno e colaboradores, (2017) constataram, que em caprinos, o plasma seminal causa influência negativa na viabilidade do sêmen congelado.

Existem cinco métodos básicos para colheita de espermatozoides diretamente da cauda do epidídimo, sendo duas delas *in situ*, com pacientes vivos, e três em animais mortos ou castrados (GUERRERO, 2006). Os métodos aplicados em pacientes vivos são a aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo (PESA) e a aspiração microcirúrgica de espermatozoides do epidídimo (MESA). Estes métodos são mais comumente aplicados em humanos. Os métodos de colheita em animais mortos ou castrados são o de flutuação, de perfuração ou o de fluxo retrógrado da cauda do epidídimo (MONTEIRO, 2013).

Na técnica de perfuração, utiliza-se uma placa de Petri, onde é colocada a cauda do epidídimo e, com auxílio de uma agulha, realiza-se a perfuração dos ductos para, em seguida, filtrar e centrifugar a amostra para que sejam removidos os contaminantes e, em seguida, criopreservar. Embora apresente boa taxa de recuperação, quando expostas à centrifugação, são separadas de restos celulares, no entanto, esse processo pode afetar a viabilidade espermática (SANTOS, 2017).

O método de colheita por flutuação consiste em cortar ou fatiar a cauda do epidídimo para que os espermatozoides sejam expostos ao meio exterior, possibilitando a migração para o meio e, posteriormente, sejam recuperados por meio de um processo de filtração (GRANEMANN et al., 2005).

A técnica de fluxo retrógrado da cauda do epidídimo é realizada por meio de um corte entre a cauda e o corpo do epidídimo. Após isso, utiliza-se uma seringa para exercer pressão nos ductos deferentes, de modo que os espermatozoides extravasem pelo corte realizado inicialmente (MONTEIRO, 2013). A pressão gerada pela seringa pode ser tanto por meio da injeção de ar, como de algum líquido não deletério aos espermatozoides (GERMANN et al., 2005).

### **2.3 Diluidor de sêmen**

Os diluentes seminais possuem diversas funções importantes, entre elas a proteção da membrana espermática contra danos provocados pelo choque térmico ocorrido durante a criopreservação e fornecimento de fonte de energia decorrente da adição de nutrientes, além de possuir efeito tampão, manter a pressão osmótica (CÂMARA et al., 2018) e facilitar a divisão do ejaculado em doses de sêmen, além de tornarem o meio favorável para a sobrevivência dos espermatozoides *in vitro* (SOUSA et al., 2020).

Há uma enorme variedade de diluentes, sejam eles comerciais ou não, para a utilização no processo de criopreservação do sêmen caprino (CORREDOR, 2014). A escolha de um bom diluente deve ter como foco a ausência de toxicidade à célula espermática, poder nutritivo e baixo custo, além de possuir ação tamponante e de estabilização da membrana e pH ideal para a espécie (SANTOS et al., 2018), como o Tris; um ou mais açúcares, como glicose, lactose, frutose ou trealose; sais como citrato de sódio; crioprotetores penetrantes (etilenoglicol ou glicerol) ou não penetrantes (gema de ovo ou leite desnatado); e antibióticos, como a penicilina e a estreptomicina (GIBBONS, 2002).

Dentre os vários diluidores utilizados na criopreservação do sêmen, a gema de ovo e o leite desnatado são os mais comuns, embora seu uso possa acarretar inibição da motilidade espermática e induzir a reação acrossomal, decorrente de problemas de interação com enzimas do plasma seminal (CÂMARA et al., 2017). Além do fato de se tratarem de produtos de origem animal, o que representa um risco potencial de contaminação (SANTOS et al., 2018).

### 2.3.1 Diluidor à base de Leite Desnatado

O leite é um líquido orgânico bastante utilizado como diluente para o sêmen caprino. Apresenta alta propriedade biológica de conservação dos espermatozoides, uma vez que possui capacidade tampão, boa viscosidade, quantidade abundante de carboidratos que podem ser utilizados pelas células espermáticas para produção de energia, além de possuírem capacidade tampão (CASTELO et al., 2008; MANJUNATH, 2012).

Os diluentes à base de leite desnatado são bastante utilizados para sêmen caprino e demonstram preservar a capacidade fertilizante dos espermatozoides por cerca de 12 a 24 horas. Todavia, apesar de ser um meio fisiológico, é bastante complexo, o que faz com que sua capacidade de preservação celular não seja bem elucidada, visto que pode apresentar resultados variados (BISPO, 2009; COUTINHO DA SILVA et al., 2012).

### 2.3.2 Diluidor à base de Gema de ovo

Trata-se de um componente amplamente utilizado na criopreservação do sêmen de animais domésticos, pois apresenta efeito protetor sobre a membrana plasmática da célula espermática. Isso se deve ao fato de sua composição apresentar frações lipoproteicas de baixa intensidade, como a fosfatidilcolina, que, ao interagir com a superfície da célula, tem a capacidade de restaurar a perda de fosfolipídeos, comumente observado no processo de resfriamento (OLIVEIRA, 2016). Além de sua proteção à membrana espermática, a gema de ovo é também conhecida por servir como uma fonte proteica no diluente (CÂMARA et al., 2018).

Roy (1957) constatou que, quando diluídas em gema de ovo, as células espermáticas tiveram a sua motilidade mantida, desde que o plasma fosse removido. Todavia, quando adicionado ao sêmen puro, a gema coagulou e os espermatozoides morreram. Este fato ocorreu devido a interações prejudiciais entre o plasma seminal de caprinos e a gema de ovo, devido às enzimas coaguladoras da gema do ovo (EYCE) (SILVA, 2015). Estas enzimas possuem atividade fosfolipase e hidrolisam a lecitina, que é um fosfolipídeo presente tanto na gema do ovo quanto na membrana plasmática dos espermatozoides, em ácidos graxos e lisolecitinas, que são tóxicos para o espermatozoide. Desta forma, tanto as enzimas que compõem o sêmen

caprino quanto a gema do ovo possuem elevada importância no processo de criopreservação (BEZERRA, 2010). A interação da gema com a EYCE, que incorre na produção de substâncias tóxicas aos espermatozoides, faz com que haja inibição da motilidade espermática (CÂMARA et al., 2017).

Os grânulos formados pela coagulação da gema causam opacidade óptica, o que dificulta a avaliação microscópica imediata, sendo mais uma das desvantagens da utilização da gema de ovo na composição do diluente (SANTOS et al., 2018).

Apesar de ser bastante utilizada para estabilizar as membranas biológicas, o que diminui os efeitos causados pelo choque térmico, a gema de ovo deve ser usada com cautela, em decorrência dos problemas relatados acerca da interação dos espermatozoides com a EYCE (SOUSA, 2020). A redução da concentração da gema de ovo a 2,5% não prejudica a viabilidade pós-descongelamento dos espermatozoides, o que possibilita a utilização de diluidores contendo concentrações menores de gema na criopreservação do sêmen caprino (MARTINS, 2019).

Embora existam inconvenientes ao utilizar diluidores à base de gema de ovo e de leite desnatado na criopreservação de sêmen caprino, Queiros (2018) relatou que a prática da centrifugação, ao separar o plasma seminal das células espermáticas, mostra-se eficiente para evitar as reações indesejadas entre o sêmen, a EYCE e SUB-III, embora possa exercer influência negativa na integridade da membrana plasmática e do acrossoma do espermatozoide. Como forma de minimizar os efeitos indesejados causados pela centrifugação e manter a proteção às células, a utilização do tempo e velocidade adequados, além de pré-diluidores, devem ser aliados (NEVES, 2008).

## **2.4 Criopreservação de sêmen**

Devido ao rápido desenvolvimento do agronegócio, os pequenos ruminantes, que incluem os caprinos e ovinos, tem apresentado uma redução na diversidade de raças desses animais, em todo o mundo. Acredita-se que tal fato deve-se, principalmente, à preferência por raças de alta produtividade para fins comerciais, que apresentam intensa atividade reprodutiva e alta seleção artificial (MARTINS, 2019).

A conservação seminal, aliada à inseminação artificial, tem sido importante no que diz respeito aos avanços genéticos da espécie. O sêmen pode ser processado de formas variadas (SOUSA, 2020), sendo a criopreservação amplamente utilizada como

um procedimento eficiente para conservação genética dos pequenos ruminantes (CHUNRONG, 2019). Em caprinos, o sêmen foi congelado pela primeira vez em 1950, por Smith e Polge, os quais relataram que a fertilidade pós-descongelação era muito baixa (BISPO, 2009).

O processo de criopreservação consiste em congelação a temperaturas muito baixas, geralmente  $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$ , de células e tecidos biológicos, o que possibilita, além da conservação genética, reduzir custos relacionados ao transporte de reprodutores, acesso mais amplo a locais mais distantes (HOLT, 2003; BARROSO, 2018), minimizar a propagação de doenças sexualmente transmissíveis (SUN et al., 2019), e conservar por longos períodos a capacidade fecundante do sêmen (CÂMARA et al., 2017). Todos estes fatores favorecem a utilização do sêmen em momentos de contra-estação reprodutiva (BEZERRA, 2010).

Embora demonstre resultados satisfatórios, a criopreservação apresenta algumas limitações, como o custo elevado decorrente da necessidade de equipamentos específicos para a sua realização (MATIAS et al., 2019). Além disso, o processo de refrigeração e reaquecimento provoca mudanças repentinas de temperatura, podendo ocasionar a formação de cristais de gelo, que, por sua vez, afetam a integridade dos espermatozoides (SALAMON; MAXWELL, 2000; SANTOS et al., 2018).

O sêmen congelado deve ser submetido ao processo de descongelação, que ocorre, tradicionalmente, com o sêmen caprino envasado em palhetas e submetido à temperatura de  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 12 a 30 segundos. O emprego de temperaturas mais altas, deve ser feito de maneira cautelosa, visto que o tempo se torna um fator crítico. Desta forma, a descongelação a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  é a mais recomendada na prática, em decorrência da diminuição do risco de superaquecimento, que pode acarretar altas taxas de mortalidade espermática (BEZERRA, 2010; BEZERRA et al., 2011).

A qualidade do sêmen criopreservado determina a taxa de concepção, por isso, tem influência direta no sucesso da inseminação artificial. Por conseguinte, faz-se necessário o monitoramento regular da qualidade do material durante todo o processo de congelação e descongelação (YADAV, 2016).

A tecnologia de criopreservação de gametas vem sendo cada vez mais aplicada e se mostra fundamental no que diz respeito à manutenção do potencial reprodutivo das espécies no futuro (SOUZA et al., 2013). Durante o processo de criopreservação, o espermatozoide passa pelas etapas de refrigeração, congelação e

descongelamento (LEITE et al., 2011). Uma vez que a solução chega à temperatura entre -5 °C e -15 °C, há a formação de cristais de gelo, que traz como resultado o aumento da concentração de soluto extracelular (OLIVEIRA et al., 2016).

## 2.5 Proteína anticongelante

Na década de 70 foi identificada uma classe de proteínas capaz de interagir e influenciar o crescimento do núcleo dos cristais de gelo, reduzir o ponto de fusão da água, bem como inibir a recristalização. São as chamadas proteínas anticoagulantes (PACs), provenientes de peixes de água fria e encontradas também em plantas e microrganismos adaptados a baixas temperaturas (DEVRIES; WOHLSCHLAG, 1969).

Por meio da utilização experimental de proteínas anticongelantes na criopreservação de oócitos imaturos bovinos, Rubinsky (1991) relatou que as células de mamíferos, sensíveis ao frio, tornam-se mais resistentes após a adição das PACs, que protegem as células e suas membranas dos efeitos causados pela baixa temperatura.

As PACs são subdivididas em quatro grupos, PAC I, II, III e IV, numeradas sequencialmente, de acordo com a ordem que foram descobertas, e variam entre si quanto a tamanho, composição e fonte (BAARDSNES et al., 1999), além da GPAC (glicoproteína antocongelante) (PAYNE; YOUNG, 1995; PROVESI; AMANTE, 2015).

As PACs de vegetais têm ganhado destaque devido à capacidade de inibir o processo de cristalização, mesmo em concentrações baixas (< 25µg/L), provavelmente pela interação dessas proteínas com cristais de gelo. Isto se deve ao fato das PACs serem encontradas apenas em variedades vegetais de inverno, adaptadas à exposição a baixas temperaturas (PROVESI; AMANTE, 2015).

Existem três prováveis maneiras de interação entre as proteínas anticongelantes (PACs) e os cristais de gelo. A interação pode ocorrer através do processo de nucleação, onde algumas PACs se ligam a substâncias nucleadoras e impedem que haja a formação de cristais de gelo. A segunda maneira é por meio da diminuição da temperatura de congelamento para atingir a histerese térmica, que, a depender da proteína utilizada e de uma maior concentração da mesma, pode reduzir

o ponto de congelação da água em até 3 °C. E, por último, através da utilização de uma PACs, que, mesmo sem a necessidade de quantidades elevadas, tem a capacidade de inibir a recristalização em concentrações menores do que 100 µg/L (PROVESI; AMANTE, 2015).

## **2.6 Método de Avaliação Espermática**

A análise do sêmen inclui testes tanto macroscópicos quanto microscópicos, a fim de identificar e classificar a amostra como apta ou não para seu emprego nos sistemas de inseminação artificial (CORREDOR, 2014).

A avaliação espermática é indispensável para garantir a seleção de um sêmen de qualidade para que seja submetido à criopreservação e, ainda assim, mantenha motilidade e vigor favoráveis pós-descongelação, visto que a motilidade é o principal parâmetro analisado para avaliar a capacidade fertilizante de uma amostra de sêmen (COUTO, 2018).

### **2.6.1 Sistema Automático de Análise Espermática (CASA)**

A motilidade espermática é mais comumente avaliada por meio da utilização de microscópio óptico e um técnico experiente, mas o método pode fornecer informações com variações, entre as avaliações, que vão de 30 a 60 %, a depender de quem esteja realizando o procedimento, o que torna a avaliação subjetiva e imprecisa. A fim de reduzir essas diferenças e aumentar a fidedignidade dos resultados, existe a alternativa da utilização de sistemas computadorizados (SNOECK, 2020).

O CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) é um sistema proposto por Dotty Foster, em 1979 (CORREDOR et al., 2013), capaz de fornecer imagens sucessivas dos espermatozoides, fornecendo informações precisas das características morfológicas e funcionais dos mesmos (AMANN; KATZ, 2013).

Os primeiros sistemas computadorizados a serem comercializados com a finalidade de avaliar a motilidade espermática foram o CellSoft®, em 1985, e o HTM 2000® em 1986, ambos para uso em laboratórios de pesquisa. Em 1992 surgiu o HTM-IVOSS Sperm Analyzer®, um sistema integrado de computador e microscópio, que permitia a obtenção de imagens e forneciam a porcentagem dos espermatozoides móveis, bem como sua média de velocidade (MATOS et al., 2008).

As maiores vantagens dos sistemas computadorizados estão na produção dos resultados de maneira rápida e precisa de vários parâmetros, como taxa de espermatozoides móveis e as características desses movimentos, além de possibilitar a obtenção de informações individuais e da população espermática como um todo (NEUMANN, 2019).

No entanto, entre as suas desvantagens, incluem-se os altos custos com a aquisição dos equipamentos e *softwares*, bem como a sua configuração, somado à necessidade de seguir rigorosamente alguns critérios específicos para que obtenha o máximo possível de precisão e sensibilidade. Dentre estes critérios, incluem-se padronização da diluição utilizada, concentração, taxa de captura da câmara e duração da cena, o que permite que os resultados possam ser comparados entre laboratórios que utilizam o mesmo sistema (NEUMANN, 2019).

O *software* é programado com uma micrometragem mínima e uma máxima, que dependem da espécie animal a ser avaliada. Os objetos que apresentarem tamanho que se adequem à faixa estabelecida, são considerados espermatozoides e estarão presentes nas imagens. O sistema trabalha realizando a captura de fotos sucessivas dos espermatozoides, por meio de um sistema estroboscópico acoplado ao computador, e, quando unidas, formam um vídeo com todo o trajeto da célula espermática, possibilitando obter informações de alta precisão destes gametas. A cabeça do espermatozoide é a parte avaliada, marcando onde se encontram em cada uma das fotos, visto que é a parte mais fácil de se observar o movimento (BERGSTEIN, 2014).

Após a identificação de seu trajeto, as células espermáticas são avaliadas quanto ao seu movimento e classificadas, dentro de padrões definidos, como móvel não progressivo, linear lento, linear rápido ou imóvel. Para que esses padrões sejam definidos, são mensurados: VAP – velocidade do trajeto; VSL – velocidade progressiva; VCL – velocidade curvilinear; ALH – amplitude de deslocamento lateral de cabeça; BCF – frequência de batimentos do flagelo; STR – retilinearidade; e LIN – linearidade (SANTOS, 2017).

## 2.6.2 Análise por Fluorescência

A funcionalidade dos espermatozoides é monitorada por procedimentos de coloração, conhecidos como sondas fluorescentes, que se ligam a estruturas



específicas das células e permitem um diagnóstico fácil. As afinidades específicas das sondas por pontos específicos dos espermatozoides são determinadas pela interação entre as proteínas e lipídeos presentes nas membranas dos espermatozoides e nas sondas fluorescentes (SANTOS, 2018).

As sondas podem ser utilizadas isoladamente ou em associação, o que possibilita a avaliação de compartimentos espermáticos diferentes simultaneamente, como a observação do potencial de membrana mitocondrial, integridade da membrana plasmática, reação acrossômica, entre outros (SANTOS et al., 2018). Após coradas, as células podem ser avaliadas em citômetro de fluxo ou microscopia de fluorescência (ARRUDA et al., 2011).

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para avaliar a integridade e viabilidade espermática, cujo sistema automatizado possui a capacidade de avaliar cerca de trinta mil células em um tempo inferior a um minuto (ARRUDA et al., 2011). Esta análise fornece dados sobre todas as células de uma amostra, o que a torna ideal para a avaliação dos espermatozoides, por se tratarem de populações heterogêneas (SOUZA, 2017).

A análise por citometria de fluxo possui alto nível de repetibilidade, é objetiva e permite a utilização de amostras com volumes reduzidos, além da possibilidade de avaliar mais de um atributo em um mesmo espermatozoide, por meio da adição de múltiplos fluorocromos (BATISTA; GUERRA, 2010).

Por meio da técnica de citometria de fluxo, a contagem e classificação das células ocorre em solução aquosa, que é direcionada a um fluxo onde as células passam através de um feixe de luz ou laser, que excita as sondas fluorescentes aderidas às células e capta a frequência da luz. Essa frequência é convertida pelo equipamento em sinais elétricos, os quais são quantificados rapidamente por *softwares* (BERGSTEIN et al., 2014).

As técnicas de coloração com sondas fluorescentes têm sido usadas como ferramenta de auxílio na determinação da funcionalidade dos espermatozoides, após processo de congelação e descongelação, auxiliando na análise do DNA, de membranas, lectinas e de enzimas intracitoplasmáticas (SILVA et al., 2009).

Muitos corantes fluoróforos têm sido utilizados, pois reagem com as enzimas citoplasmáticas ou se ligam ao DNA. Os mais utilizados para análise da integridade da membrana dos espermatozoides de caprinos são o iodeto de propídio (IP) em

associação ao diacetato de carboxifluoresceína (DFC); o IP em associação com o SYBR®14 e o Hoechst 33258 (BATISTA; GUERRA, 2010).

As membranas são avaliadas quanto à sua integridade, após exposição aos corantes impermeáveis às membranas, uma vez que os gametas vivos não são corados (BATISTA; GUERRA, 2010). Estudos citam o uso do brometo de etídio para a avaliação da integridade da membrana dos espermatozoides, pois caracteriza-se como uma sonda que não ultrapassa a membrana, mas tem especificidade ao DNA. Ao impermeabilizar a membrana, o brometo entra na célula e se liga à dupla hélice do DNA, fazendo com que sua fluorescência aumente em onze vezes. Apesar da sua alta funcionalidade, sua utilização é restrita devido a sua alta toxicidade (CELEGHINI, 2005).

O iodeto de propídio (IP) possui afinidade pelo DNA e cora em vermelho o núcleo das células com membrana plasmática (BATISTA; GUERRA, 2010). O DFC, por sua vez, é um éster não polar e não fluorescente, além de mostrar-se permeável à membrana plasmática. Uma vez dentro da célula, o mesmo é hidrolisado e resulta em um composto impermeável à membrana plasmática, que fluoresce em verde. A utilização do IP e DFC possibilita a obtenção de resultados confiáveis no que diz respeito à integridade da membrana, pois a membrana íntegra será corada em verde pela ação do DFC e a membrana lesada, por sua vez, será corada em vermelho em decorrência da ligação do IP ao núcleo celular (SILVA et al., 2009).

A incapacidade de fertilização dos espermatozoides pode ser originária de diversos fatores, o que justifica a eficácia da mensuração de vários parâmetros espermáticos simultaneamente. Portanto, o uso de sondas fluorescentes, por sua capacidade de ligar-se a compartimentos específicos das células, permitindo a análise de diferentes compartimentos, aumenta a precisão das análises de sêmen. A associação de sondas fluorescentes é uma técnica usual na análise de potencial da membrana mitocondrial e das estruturas acrossomal e da membrana plasmática (SILVA; GUERRA, 2012).

As amostras coradas com a utilização de sondas fluorescentes podem ser analisadas através de citômetro de fluxo ou da utilização de um microscópio de fluorescência. A avaliação pela citometria de fluxo ocorre através do direcionamento de uma solução aquosa a um fluxo linear, onde as células passam, uma a uma, através de um feixe de luz que, por sua vez, excita as sondas fluorescentes e capta a frequência da luz (BERGSTEIN et al., 2014).

### 2.6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica é um método eficaz para a análise morfológica em escala nanométrica, pois possui maior poder de resolução e aumento. Possibilita obtenção de micrografias tridimensionais com minúcias da superfície e da profundidade, fornece imagens tridimensionais. É uma ferramenta valiosa para caracterizar a ultraestrutura de espermatozoides durante o processo de criopreservação (KLEIN; BUHR; FRASE, 2012).

O MEV convencional é composto por uma coluna óptica eletrônica que se adapta à câmara da amostra, sistema eletrônico, detectores e sistema de vácuo. Possui uma alta resolução e apresenta uma imagem tridimensional, o que o torna um dos instrumentos mais versáteis no que diz respeito à observação de características microestruturais de objetos. Este equipamento consiste de um feixe de elétrons capaz de explorar toda a superfície da amostra, detalhadamente, com posterior transmissão de sinal do detector a uma tela em que a varredura se encontra sincronizada com o feixe de elétrons. O sinal captado pelo detector modula o brilho do monitor, permitindo, assim, a observação do material (DEADIV et al., 2007).

Para a análise estrutural dos espermatozoides no MEV é realizado um esfregaço em lâmina de vidro, com sêmen fresco. Imediatamente após sua secagem, são submetidas à solução fixadora em solução de glutaraldeído a 2,5%, seguido da lavagem das mesmas, por três vezes, em PBS e, posteriormente, fixadas em solução a 1% de tetróxido de ósmio. Em seguida, as lâminas são lavadas novamente por três vezes em PBS, e desidratadas em solução de etanol, em diferentes concentrações, de forma gradativa (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%). Após este procedimento, as lâminas passam pelo processo de secagem no ponto crítico e são metalizadas com uma camada de ouro, antes de serem submetidas à análise no microscópio (PERES, 2005).

### **3 OBJETIVOS**

Determinar o efeito da adição da proteína anticongelantes do tipo III (PAC III), nas concentrações de 1, 10 e 100  $\mu\text{g/mL}$  aos diluidores de criopreservação de espermatozoides caprinos, oriundos do epidídimo ou de ejaculados, sobre a viabilidade espermática e avaliação ultra estrutural destas células, pós-descongelação.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANN, R. P.; KATZ, D. F. Andrology Lab Corner\*: Reflections on CASA After 25 Years. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 3, 2004.

ARAUJO SILVA, R. A. J.; BATISTA, A. M.; ARRUDA, L. C. P.; SOUZA, H. M.; NERY, I. H. A. V.; GOMES, W. A.; SOARES, P. C.; SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Concentration of soybean lecithin affects short-term storage success of goat semen related with seminal plasma removal. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 4, p. 895-901, 2019.

ARRUDA, R. P.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; LEMES, K. M.; JAIMES, J. D.; COLEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L. Z.; NASCIMENTO, J. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 145-15, 2011.

BAARDSNES, J.; KONDEJEWSKI, H. L.; HODGES, R.; CHAO, H.; KAY, C.; DAVIES, P. L. New ice-binding face for type I antifreeze protein. **FEBS Letters**, v. 463, p. 87-91, 1999.

BARROSO, M. L. S. Caracterização preliminar de proteínas relacionadas à criopreservação do sêmen caprino. **Dissertação** (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, 2018.

BATISTA, A. M.; GUERRA, M. M. P. Novas técnicas para avaliação da qualidade do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 3, p. 125-132, 2010.

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

BERTOL, M. A. F.; WEISS, R. R.; FUJITA, A. S.; KOZICKI, L. E.; ABREU, A. C. M. R.; PEREIRA, J. F. S. Dois diluentes comerciais na criopreservação de espermatozoides do epidídimo de touros. **Ciência Rural**, v. 44, n. 9, 2014.

BEZERRA, F. S. B. Criopreservação do sêmen caprino sob refrigeração ou congelamento. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, supl., p. s20-s25, 2010.

BEZERRA, F.S.B.; CASTELO, T.S.; ALVES, H.M.; et al. Objective assessment of the cryoprotective effects of dimethylformamide for freezing goat semen. **Cryobiology**, v. 63, p. 263-266, 2011.

BISPO, C. A. S. Fertilidade do sêmen caprino resfriado ou congelado em diferentes concentrações de gema de ovo no diluente. **Tese** (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

BICUDO, S.D.; SOUZA, D.B.; TAKADA, L. Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovino refrigerado e biotécnicas associadas como estratégias de intensificação do manejo reprodutivo. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 15, 2003. Porto Seguro – BA. **Anais...** Belo Horizonte - MG: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2003.

CÂMARA, T. S.; NETO, M. F. V.; CARVALHO, M. A. M.; NUNES, J. F. Fatores envolvidos na criopreservação do sêmen caprino. **Ciência Animal**, v. 27, n. 3, p. 64-79, 2017.

CÂMARA, T. S.; NUNES, T. G. P.; TONIOLLI, R. Diluentes seminais para pequenos ruminantes. **Ciência Animal**, v. 28, n. 2, p. 67-83, 2018.

CAMPOS, A. C. N. Morfometria do Trato Genital Masculino: Influência do Plasma Seminal Obtido em Época Seca ou Chuvosa Sobre Espermatozóides de Caprinos. **Tese** (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2003.

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

CELEGHINI, E. C. C. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. **Tese** (Doutorado em Reprodução Animal) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CHUNRONG, L.; WU, G.; HONG, Q.; QUAN, G. Spermatozoa Cryopreservation: State of art and future in small ruminants. **Biopreservation and Biobanking**, v. 17, n. 2, 2019.

CORREDOR, L. H.; OSUNA, A. N.; VILLAMIZAR, D. H.; PARADA, J. R.; MORENO, A. Q. Evaluación de la motilidad espermática através del sistema C.A.S.A de semen caprino criopreservado bajo diferentes medios diluyentes. **Respuestas**, v. 18, n. 2, p. 16-27, 2013.

CORREDOR, L. H. **Evaluación de la motilidad espermática de semen caprino criopreservado bajo diferentes medios diluyentes através del sistema casa**. Especialização em Melhoramento Genético - Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuárias y del medio ambiente, 2014.

COUTINHO DA SILVA, M. A.; SEIDEL JR., G. E.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K.; CARNEVALE, E. M. Effects of components of semen extenders on the binding of stallion spermatozoa to bovine or equine zonae pellucidae. **Reproduction**, v. 143, p. 577–585, 2012.

COUTO, D. N. **Relatório do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária**. Relatório (Bacharelado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, 2018.

CUNNINGHAM, J. G.; KLEIN, B. G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. ED.4, Rio de Janeiro: Elsevier, 710p, 2008.

DEADIV, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: Aplicações e preparações de amostras: metálicos e semicondutores**. Porto Alegre: Edipucrs, 2007.

DEVRIES, A. L.; WOHLSCHLAG, D. E. Freezing resistance in some Antarctic fishes. **Science**, v. 163, p. 1073–1075, 1969.

GUASTI, P. N.; MONTEIRO, G. A.; PAPA, F. O. Componentes do plasma seminal e sua influência sobre a criopresevação e fertilidade de espermatozoides equinos. **Veterinaria e Zootecnia**, v. 19, n. 2, p. 169-180, 2012.

GRANEMANN, L. C.; WEISS, R. R.; KOZICKI, L. E.; MURADAS, P. R.; TREML, T. E. Número total de espermatozóides de garanhões obtidos através da colheita com vagina artificial e por fluxo retrógrado da cauda do epidídimo. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 1, p. 73-77, 2005.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 513 p., 2004.

HOLT, C.B. Substances which inhibit ice nucleation: a review. **Cryo Letters**, v. 24, p. 269–274, 2003.

IBGE. **Pesquisa Pecuária Municipal**, 2013. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=3939&z=p&o=29&i=P>.

KLEIN, T.; BUHR, E.; FRASE, C. G.; TSEM: **A Review of Scanning Electron Microscopy in Transmission Mode and Its Applications**. In: Hawkes, P. (Ed.). *Advances in Imaging and Electron Physics*, 171, p. 297- 356, 2012.

LEITE, P. A.; SCHREDERA, G. G.; ALMEIDA, C. L. R.; ZÚCCARIA, C. E. S. N.; SILVA, E. V. C. Bovine Semen Cryopreservation. **Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 12, n. 4, p. 279-86, 2011.

LV, C.; WU, G.; HONG, Q.; QUAN, G. Spermatozoa cryopreservation: State of art and future in small ruminants. **Biopreservation and Biobanking**, p. 1–12, 2018.

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



MARTINS, H. B. Efeito da criopreservação do sêmen de caprinos da raça serpentina através da avaliação microscópica e do computer assisted sperm analysis (CASA). **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2019.

MATIAS, M. C.; MELO, M. M. S.; MENDONÇA, M. S. B.; SOUZA, C. W. C.; NETO, L. F. C.; CÂMARA, D. R. Vitrificação de espermatozoides em pequenos ruminantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43, n. 2, p. 105-110, 2019.

MATOS, D. L.; ARAÚJO, A. A.; ROBERTO, I. G.; TONIOLLI, R. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 4, p. 225-232, 2008.

MONTEIRO, G. A. Criopreservação e fertilidade de espermatozoides do ejaculado e recuperados da cauda do epidídimo de garanhões subfêrteis. **Tese** (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

NEVES, M. M. Extração das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo de *Gallus domesticus* e sua aplicação na criopreservação do sêmen canino. **Tese** (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

NEUMANN, G. Influência da qualidade de imagens e técnicas de rastreamento nos resultados de análise espermática assistida por computador (CASA-Mot) em peixes. **Tese** (Doutorado em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2019.

OLIVEIRA, C. T. S. A. M. Criopreservação do sêmen caprino em diferentes concentrações espermáticas associado ou não a melatonina. **Tese** (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2016.

PAULA, N. R. O.; ANDRIOLI, A.; CARDOSO, J. F. S.; SANTOS, D. O.; ELOY, A. M. X. **Reprodução no macho caprino: análise básica e aplicada**. Embrapa Caprinos e Ovinos, 2008. Disponível

em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/534117/1/doc79.pdf>  
f. Acesso em: 17 de julho de 2021.

PAYNE, S. R.; YOUNG, O. A. Effects of pre-slaughter administration of antifreeze proteins on frozen meat quality. **Meat Science**, v. 41, n. 2, p. 147-155, 1995.

PERES, M. A. Colheita e Avaliação do Sêmen de Bicho Preguiça. **Dissertação** (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

PROVESI, J. G.; AMANTE, E. R. Revisão: Proteínas anticongelantes – uma tecnologia emergente para o congelamento de alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 1, 2015.

QUEIROS, A. F. Avaliação dos Efeitos das Combinações de Crioprotetores e da Remoção do Plasma Seminal na Criopreservação de Sêmen Caprino. 2018. 53f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2018.

ROBLES, V.; VALCARCE, D. G.; RIESCO, M. F. O uso de proteínas anticongelantes na criopreservação de gametas e embriões. **Biomolecules**, v. 9, p. 181, 2019.

ROCHA, J. F. P. Efeito da composição bioquímica dos espermatozoides da cauda do epidídimo e ejaculado resfriados a 5 °C. **Dissertação** (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

ROY, A. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. **Nature**, v. 179, p. 318-319, 1957.

RUBINSKY, B.; ARAV, A.; FLETCHERS, G. L. Hypothermic protection - A fundamental property of "Antifreeze" proteins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 180, n. 2, p. 566-571, 1991.

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

SANTIAGO-MORENO, J.; ESTESOA, M.C.; CASTAÑO, C.; TOLEDANO-DIAZA, A.; DELGADILLO, J.A.; KERTCHUNHAKIATA, K. Effects of Extenders on Fresh and Freezing Semen of Boer Goat. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 11, p. 125–130, 2016.

SANTOS, F. C. C. Sêmen da cauda do epidídimo de garanhões submetido à centrifugação com coloide. **Tese** (Doutorado em Medicina Animal: Equinos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017.

SANTOS, A. G. F. Aspectos clínico-andrológicos de reprodutores da espécie equina submetidos a ultrassonografia doppler no estado da Paraíba. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2018.

SANTOS, B. M. B.; BRITO, B. F.; MAIA, L. C. P.; PIRES, R. S. C.; SALGUEIRO, C. C. M.; NUNES, J. F. Congelação do sêmen de pequenos ruminantes sem uso de gema de ovo utilizando bases vegetais em substituição à gema de ovo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 42, n. 3-4, p. 96-100, 2018.

SEIFI-JAMADI, A.; AHMAD, E.; ANSARI, M.; KOHRAM, H. Antioxidant effect of quercetin in an extender containing DMA or glycerol on freezing capacity of goat semen. **Cryobiology**, v. 75, p. 15–20, 2017.

SILVA, S. V.; BATISTA, A. M.; COLETO, Z. F.; GUERRA, M. M. P. Diferentes métodos e técnicas na avaliação espermática: uma breve revisão. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 12, n. 1/2/3, p. 1-15, 2009.

SILVA, E. C. B.; GUERRA, M. M.P. Sondas fluorescentes: um avanço na avaliação da integridade estrutural e funcional de espermatozoides. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 11, n. 2, p. 162-169, 2012.

SILVA, R. A. J. A. Utilização de diluidor livre de produtos de origem animal para refrigeração do sêmen caprino. 2015. 58f. **Dissertação** (Mestrado em Sanidade e Reprodução de Ruminantes) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns, 2015.

SNOECK, P. P. N.; PESSOA, T. H. O.; BARROS, C. H. S. C.; ALLAMAN, I. B. Padronização do Sperm Class Analyzer® (SCA®) para avaliação de espermatozoides equinos criopreservados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 04, 2020.

SOUSA, D. B. Viabilidade do sistema Equitainer® na refrigeração do sêmen ovino avaliado pelas análises computadorizada, de microscopia epifluorescente e inseminação artificial. **Dissertação** - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2002.

SOUSA, M. S.; BRITO, B. F.; CABRAL, L. A. R.; NEGREIROS, N. A. B.; PONTES, K. S.; SALGUEIRO, C. C. M. Criopreservação do sêmen de caprinos em diluidores alternativos e análise da viabilidade. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 56478-56485, 2020.

SOUZA, F.A.; LEITÃO, M. C. G.; BATISTA, A.M.; PORTO, A. L. F.; LIMA, J. L.; GUERRA, M. M. P. Proteínas do plasma seminal de caprinos relacionadas com o índice pluviométrico e a qualidade do sêmen. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, 2009.

SOUZA, T. D.; PAULA, T. A. R.; COSTA, D. S.; COSTA, E. P.; BARROS, J. B. G.; ARAÚJO, G. R.; CARRETA, M. Comparação entre duas concentrações de glicerol para a criopreservação de sêmen de suçuarana (*Puma concolor*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 512-516, 2013.

TEIXEIRA, I.A.M.; GOMES, R.A.; CASTAGNINO, D.S.; FIGUEIREDO, F.O.M.; HÄRTER, C. J.; BIAGIOLI, B.; SILVA, S. P.; RIVERA, A. R. Inovações tecnológicas na caprinocultura. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v. 14, n. 1, p. 104–120, 2013.

VIDAL, A.H.; BATISTA, A.M.; SILVA, E.C.B.; et al. Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 109, p. 47-51, 2013.

XIMENES, L.J.F.; CUNHA, A.M. da. **Setor de Peles e de couros de caprinos e de ovinos no Nordeste**. **Banco do Nordeste**, Ano VI, n.1, p.22 mar. 2012. Disponível em:<[http://www.bnb.gov.br/content/aplicacao/etene/etene/docs/ire\\_ano6\\_n1.pdf](http://www.bnb.gov.br/content/aplicacao/etene/etene/docs/ire_ano6_n1.pdf)>.

YANG, D.S.C.; SAX, M.; CHAKRABARTTY, A.; Hew, C.L. Crystal structure of an antifreeze polypeptide and its mechanistic implications. **Nature**, v. 333, p. 232– 237, 1988.

YOUNIS A.I.; ROOKS B.; KHAN S.; et al. The effects of antifreeze peptide III (AFP) and insulin transferrin selenium (ITS) on cryopreservation of chimpanzee (Pan troglodytes) spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 19, p .207–214, 1998.

## 5 Artigos

### 5.1 Artigo 1

#### **Efeito da proteína anticongelante do tipo III na congelação/descongelação de espermatozoides recuperados de epidídimo da espécie caprina<sup>1</sup>**

Millena Maria MONTEIRO<sup>1</sup>, Desirée Coelho de Mello SEAL<sup>1</sup>, Jerônimo Hugo de SOUZA<sup>1</sup>, Mariana TREVISAN<sup>1</sup>, Lúcia Cristina Pereira ARRUDA<sup>1</sup>, Sildivane Valcácia SILVA<sup>2</sup> e Maria Madalena Pessoa GUERRA<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Andrologia, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, Pernambuco, Brasil; <sup>2</sup>Departamento de Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, Paraíba, Brasil.

**\*Autor para correspondência:** M. M. Monteiro, Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE. Brasil. Tel: +55 81 3320 6412, Fax: 3320 6057. E-mail: millena.vet@gmail.com.

#### **Resumo**

Objetivou-se avaliar o efeito da proteína anticongelante tipo III (PAC III) na congelação de espermatozoides epididimários de caprinos. Foram obtidos 16 pares de testículos, em abatedouro, transportados a, aproximadamente, 5 °C em caixa térmica, até o recebimento e processamento do mesmo no laboratório em torno de 10 horas. Os espermatozoides do epidídimo foram recuperados por lavagem retrógrada e avaliados com microscópio de contraste de fase. Em seguida, criopreservados em diluidor à base de Tris-gema de ovo, suplementado com proteína anticongelante tipo III (0; 1; 10; 100 µg/mL), utilizando sistema automatizado. Após a descongelação (37 °C/30 seg), foram avaliadas cinética espermática, pelo sistema automatizado CASA, integridade de membrana plasmática e acrossomal, potencial de membrana

---

<sup>1</sup> Artigo formatado e enviado para a revista Livestock Science

mitocondrial e produção intracelular de ROS, por citometria de fluxo. Não houve diferença ( $P \geq 0,05$ ) entre os grupos experimentais para os parâmetros de cinética espermática, potencial de membrana mitocondrial e produção de ROS. No entanto, a integridade de membrana plasmática e acrossomal dos espermatozoides congelados com 100  $\mu\text{g/mL}$  de PAC III foi inferior ( $P < 0,05$ ) ao grupo controle. Conclui-se que a adição da PAC III ao diluidor Tris-gema de ovo, usado na congelação de espermatozoides obtidos do epidídimo de caprinos, não melhora a preservação dessas células. Além disso, a concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  compromete a integridade de membrana plasmática e acrossomal.

**Palavras-chave:** Criopreservação; bode; citômetro de fluxo; cinética espermática; cristais de gelo.

## 1 Introdução

A recuperação de espermatozoides epididimários, associado à técnica de criopreservação, representa uma importante ferramenta para a conservação de material genético de reprodutores, principalmente em casos de doenças ou morte súbita. Essas biotécnicas permitem que o germoplasma desses indivíduos possa ser obtido e armazenado por tempo indeterminado (LUVONI, 2006; VILELA et al., 2017).

Durante o processo de criopreservação, alterações físicas e químicas, como a formação de cristais de gelo e alta pressão osmótica, interferem nas membranas espermáticas, afetando a viabilidade celular e a capacidade de fertilização (PENA et al., 2012). Como alternativa para minimizar esses danos, a adição de proteínas anticongelantes (PAC) em meios diluidores vem sendo utilizada em bovinos (PRATHALINGAM et al., 2006; MANJUNATH et al., 2002), humanos (ZANDIYEH et al., 2020), chimpanzés (YOUNIS et al., 1998), búfalos (AKHTER et al., 2012; KUMAR e ATREJA, 2012), ovinos (PAYNE et al., 1994), coelhos (NISHIJIMA et al., 2014) e peixes (BEIRÃO et al., 2012).

As PAC são uma classe de polipeptídeos encontrados em peixes, algumas espécies de insetos e plantas, que se adaptam em locais de baixas temperaturas (RUBINSKY et al., 1991). O uso dessas proteínas para a criopreservação tem se

mostrado útil, pois, além da capacidade de inibir a formação de cristais de gelo e recristalização, impede a saída de íons por meio das membranas (WANG, 2000).

Os resultados da suplementação dos diluidores de sêmen com as PACs variam de acordo com a espécie estudada. Melhores resultados pós-descongelamento foram observados para a motilidade espermática de ovinos (PAYNE et al., 1994), caprinos (LV et al., 2021) e coelhos (NISHIJIMA et al., 2014), motilidade e integridade da membrana plasmática dos espermatozoides de homens (ZANDIYEH et al., 2020), chimpanzés (YOUNIS et al., 1998) e búfalos (QADEER et al., 2014), resistência osmótica da célula espermática de bovinos (PRATHALINGAM et al., 2006) e linearidade, velocidade linear progressiva e integridade de membrana dos espermatozoides de peixes (BEIRÃO et al., 2012). No entanto, em espermatozoides de rato, a adição das proteínas anticongelantes foi deletéria à taxa de sobrevivência dessas células (KOSHIMOTO et al., 2002).

Diante dos resultados divergentes encontrados na literatura, foi proposto nesse estudo avaliar a ação das PAC do tipo III sobre a sobrevivência de espermatozoides epididimários, obtidos de caprinos e submetidos à congelamento.

## **2 Material e Métodos**

### *2.1 Reagentes*

Os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), exceto o fluorocromo CM-H<sub>2</sub>DCFDA (5-(e-6)-carboxi-2', 7'-diclorodi-hidrofluoresceína diacetato) (Molecular Probes, Life Technologies, EUA) e solução salina tamponada com fosfato (PBS; Gibco, Life Technologies, EUA). A proteína anticongelante do tipo III (PACIII) foi obtida na A/F PROTEIN CANADA INC. (Waltham, MA, EUA). A solução estoque da PACIII-1M foi preparada em DMSO e armazenada a -20 °C.

### *2.2 Colheita de testículos*

Foram obtidos 16 pares de complexo testículo epidídimo de caprinos provenientes de um matadouro localizado na cidade de Brejo da Madre de Deus-PE, Brasil, e armazenados em uma caixa térmica com gelo a aproximadamente 5 °C. Os



complexos foram transportados por volta de 10 horas até o recebimento e processamento do material.

### *2.3 Recuperação dos espermatozoides do epidídimo*

Para a recuperação espermática, utilizou-se uma lâmina de bisturi para incisão nas túnicas testiculares e extração dos testículos e epidídimos. Inicialmente, os testículos e epidídimos foram lavados em solução de cloreto de sódio a 0,9%, para a retirada de conteúdo sanguinolento proveniente da secção das túnicas. A cauda do epidídimo foi isolada do testículo e posicionada em placa de Petri. O processo de obtenção dos espermatozoides foi realizado por meio de lavagem retrógrada (GARDE et al., 1994; BRUEMMER et al., 2006).

Com o auxílio de pinça anatômica e lâmina de bisturi, o epidídimo foi dissecado e, em seguida, foi realizada uma secção em sua base para facilitar a liberação seminal. Uma seringa contendo 5 mL da solução TRIS lavagem (3.605 g Tris; 2.024 g ácido cítrico; 1.488 g frutose, 100 mL de água MilliQ, pH 6.8), aquecida a 35 °C, foi conectada ao ducto deferente e, por pressão, procedeu-se à lavagem retrógrada para obtenção dos espermatozoides. Em seguida, os gametas obtidos foram transferidos para tubos tipo Falcon e submetidos à centrifugação (600 g/5 minutos), para a remoção de resíduos celulares.

Após a centrifugação, as amostras que apresentaram valores mínimos de 50% de motilidade total (CASA) foram aprovadas, correspondendo a quatro amostras de espermatozoides de epidídimos de animais diferentes, totalizando 8 *pools*. 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, SCA TM; Microoptics, S.L., Versão 5.1, Barcelona, Espanha).

### *2.4 Criopreservação dos espermatozoides*

Para a congelação, cada *pool* de espermatozoides foi diluído em Tris-gema de ovo (3.605 g Tris; 2.024 g ácido cítrico; 1.488 g frutose, 100 mL de água, 20% gema de ovo, 5% glicerol, pH 6,8), suplementado com PAC III, de acordo com os grupos

experimentais (0, 1, 10 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ), para a concentração final de  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL. A seguir, as mostras foram envasadas em palhetas (0,25 mL), identificadas por grupo, e congeladas em sistema automatizado (TK Tecnologia em Congelação Ltda, Uberaba, Brasil). Foi usada curva de refrigeração de  $-0,25 \text{ }^\circ\text{C/min}$ , iniciando à temperatura ambiente ( $27 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Após atingir  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ , as palhetas foram submetidas ao período de estabilização durante 120 minutos e, logo após este período, foi iniciada a curva de congelação com diminuição de  $-15 \text{ }^\circ\text{C/min}$ , até chegar a  $-120 \text{ }^\circ\text{C}$ . Em seguida, as palhetas foram estocadas em nitrogênio líquido ( $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

## 2.5. Descongelação e avaliação dos espermatozoides

Duas palhetas da amostra de cada grupo experimental foram descongeladas ( $37 \text{ }^\circ\text{C}/30 \text{ seg}$ ), agrupadas e submetidas às avaliações de cinética espermática e citometria de fluxo, após cinco minutos de incubação a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 2.5.1 Análise da cinética espermática

Alíquotas ( $10 \mu\text{L}$ ) de sêmen foram diluídas em tris-gema de ovo (sem glicerol) para a concentração de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL e incubadas em banho-maria ( $37 \text{ }^\circ\text{C}/15 \text{ min}$ ). A avaliação da cinética espermática foi realizada no sistema CASA (software SCA™, Microoptics, S.L., versão 5.1, Barcelona, Espanha). Uma alíquota ( $3 \mu\text{L}$ ) da amostra diluída foi depositada sobre uma lâmina e coberta com lamínula ( $18 \times 18 \text{ mm}$ ), ambas pré-aquecidas ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ), e avaliadas em microscópio de contraste de fase (Eclipse 50i, Nikon, Japão,  $100\times$ ). As imagens foram capturadas por uma câmera de vídeo (Basler Vision Technologies TM A312FC, Alemanha). Para cada amostra, cinco campos aleatórios foram selecionados, com pelo menos 500 espermatozoides registrados. As variáveis analisadas foram: motilidade total (MT,%), motilidade progressiva (MP,%), linearidade (LIN,%), retilinearidade (STR,%), índice de oscilação (WOB,%), velocidade curvilínea (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade em linha reta (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade média da trajetória (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH,  $\mu\text{m/s}$ ), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF, Hz). Os valores do CASA foram medidos com as seguintes configurações: temperatura,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ; ampliação,  $100\times$ ; número de imagens, 25; fotos por segundo, 25; área da cabeça, 20 a  $70 \mu\text{m}^2$ .

### 2.5.2 Análise por citometria de fluxo

As análises foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Arruda et al. (2018), para o estudo da integridade de membrana plasmática e acrossomal (iPAM), potencial de membrana mitocondrial (PMM) e níveis de ROS intracelular (iROS). Alíquotas (50  $\mu$ L) de sêmen de cada grupo experimental foram distribuídas em microtubos (1,5 mL) para cada avaliação, onde foi adicionado 1 mL de PBS, e homogeneizadas. Após centrifugação (100 x g/5 min) para retirada do diluidor, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em 40  $\mu$ L de PBS.

Para a análise de iMPA, as amostras foram coradas com 5  $\mu$ L de FITC conjugado com aglutinina de amendoim (FITC-PNA) e 5,0  $\mu$ L de iodeto de propídio (IP). Após a coloração, as amostras foram incubadas por 5 min em temperatura ambiente e então avaliadas. As células que mostraram marcação PNA- / IP- foram classificadas como tendo membranas acrossomais e plasmáticas intactas; células com marcação PNA + / IP- foram classificadas como tendo acrossoma reagido e membrana plasmática intacta; células com marcação PNA- / IP + foram classificadas como tendo acrossoma intacto e membrana plasmática danificada; e as células com marcação PNA + / IP + foram classificadas como tendo membranas acrossomais e plasmáticas danificadas.

Em relação a análise de PMM, 5  $\mu$ L de JC-1 foram adicionados às amostras de espermatozoides, as quais foram incubadas por 5 min, em temperatura ambiente, e avaliadas. As células com peças intermediárias coradas de laranja foram classificadas como tendo alto potencial de membrana mitocondrial (aPMM) e aquelas com peças médias coradas em verde foram classificadas como tendo baixo potencial de membrana mitocondrial.

Para a análise de iROS, 5  $\mu$ L de CM-H<sub>2</sub>DCFDA (solução estoque 0,5 mM em DMSO; solução de trabalho 50  $\mu$ M em PBS) foram adicionados às amostras espermáticas, que foram incubadas a 37 °C por 30 min. Essas foram, posteriormente, diluídas com 1 mL de PBS e centrifugadas (100 x g/5 min), para remover o fluorocromo não ligado, e o sedimento foi ressuspense com 40  $\mu$ L de PBS. Em seguida, 5  $\mu$ L de IP foram adicionados a amostra, incubados em temperatura ambiente (5 min) e analisados. Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis com altos níveis de ROS (DCFDA+/IP-), correspondente aquelas marcadas em verde fluorescente, ou células viáveis com baixa produção de ROS

(DCFDA-/IP-), como aquelas não marcadas ou com baixa intensidade de fluorescência verde.

Todas as análises foram realizadas com o citômetro de fluxo Amnis ImageStream Mark II (EMD Millipore Corp.), equipado com uma objetiva 60x, com uma taxa de captura de imagem de 5.000 células/segundo. O tamanho da célula foi mensurado para 7  $\mu\text{m}$  e a velocidade de fluxo de 44 mm/segundo. A aquisição das imagens brutas foi obtida pelo software INSPIRE® e as análises foram realizadas no software IDEAS® (versão 6.0). Todos os fluorocromos foram excitados por um laser de 488 nm. Para a associação FITC-PNA + PI, a potência do laser usada foi de 55 mW, FITC-PNA e foi detectada no canal 2 (505–560 nm) e o IP no canal 5 (640–745 nm). Para o JC-1, a potência do laser foi de 130 mW e a detecção realizada nos canais 2 e 4 (595–640 nm). Para DCFDA + IP, a potência do laser foi de 80 mW e foi detectada nos canais 2 e 5, respectivamente. Aproximadamente 5000 eventos foram capturados por amostra.

## *2.6 Análises estatísticas*

Os dados foram testados para a normalidade, usando o Teste Shapiro-Wilk. Em seguida, as variáveis paramétricas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) unilateral, seguida do teste de Tukey. As variáveis não paramétricas foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Os dados foram expressos como média  $\pm$  SD (desvio padrão) e foram considerados significativos se  $P < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se a versão GraphPad Prism8 (Version 8.0.1).

## **3 Resultados**

Na Tabela 1 estão apresentados os parâmetros de cinética espermática (MT, MP, LIN, STR, WOB, VCL, VSL VAP, ALH e BCF) que não diferem ( $P \geq 0,05$ ) entre os grupos experimentais, independentemente das concentrações testadas de PAC III.

**Tabela 1.** Cinemática (CASA) de sêmen criopreservado de bodes em diluidor acrescido com diferentes concentrações de PAC III. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão

Variáveis	PAC III (ug/mL)			
	0	1	10	100
MT (%)	67.41 $\pm$ 4.71	64.61 $\pm$ 9.01	66.63 $\pm$ 10.83	63.91 $\pm$ 8.54
MP (%)	25.51 $\pm$ 7.06	23.36 $\pm$ 4.14	23.66 $\pm$ 12.56	21.95 $\pm$ 7.62
LIN (%)	52.35 $\pm$ 5.34	52.91 $\pm$ 4.36	53.60 $\pm$ 7.04	50.84 $\pm$ 4.44
STR (%)	77.06 $\pm$ 2.97	77.53 $\pm$ 3.55	78.19 $\pm$ 4.21	77.18 $\pm$ 2.67
WOB (%)	67.78 $\pm$ 4.44	68.19 $\pm$ 3.10	68.34 $\pm$ 5.47	65.79 $\pm$ 3.87
VCL ( $\mu$ m/s)	71.41 $\pm$ 12.79	68.75 $\pm$ 16.43	73.80 $\pm$ 10.38	69.23 $\pm$ 6.63
VSL ( $\mu$ m/s)	42.60 $\pm$ 7.27	40.44 $\pm$ 5.25	41.08 $\pm$ 8.02	38.59 $\pm$ 6.61
VAP ( $\mu$ m/s)	55.09 $\pm$ 7.98	52.28 $\pm$ 6.87	52.31 $\pm$ 8.20	49.96 $\pm$ 8.24
ALH ( $\mu$ m/s)	2.86 $\pm$ 0.39	2.71 $\pm$ 0.43	2.78 $\pm$ 0.42	2.78 $\pm$ 0.45
BCF (Hz)	11.44 $\pm$ 0.89	11.38 $\pm$ 0.63	11.70 $\pm$ 0.82	11.79 $\pm$ 0.82

PAC III - proteína anticongelante do tipo III; MT – motilidade total; MP – motilidade progressiva; LIN- linearidade; STR- retinilearidade; WOB: índice de oscilação; VCL – velocidade curvilínea, VSL – Velocidade em linha reta; VAP – velocidade média da trajetória; ALH- amplitude de deslocamento lateral da cabeça; BCF- frequência de batimento flagelar cruzado. A, B, C, D: letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística entre os tratamentos (P <0,05).

O percentual de espermatozoides portadores de membrana plasmática e acrossomal integras (Tabela 2) congelados em Tris-gema de ovo suplementado com 100  $\mu$ g/mL de PAC III foi inferior (P < 0,05) ao grupo controle (sem adição de PAC III). No entanto, as amostras congeladas nas concentrações de 1 e 10  $\mu$ g/mL de PAC III não diferiram (P  $\geq$  0,05) do grupo controle (sem adição de PAC III) e nem do suplementado com 100  $\mu$ g/mL da proteína.

**Tabela 2.** Integridade de membrana plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, níveis de ROS intracelular (citometria de fluxo) de sêmen criopreservado de bodes, em diluidor acrescido com diferentes concentrações de PAC III. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão

Variáveis	PAC III (ug/mL)			
	0	1	10	100
iMPA (%)	36.17 $\pm$ 7.57 <sup>a</sup>	30.69 $\pm$ 4.49 <sup>ab</sup>	29.02 $\pm$ 6.69 <sup>ab</sup>	26.51 $\pm$ 6.17 <sup>b</sup>
MMP (%)	14.61 $\pm$ 8.84	18.81 $\pm$ 12.05	18.88 $\pm$ 11.44	22.16 $\pm$ 13.16
iROS (%)	79.02 $\pm$ 35.51	88.67 $\pm$ 23.13	86.54 $\pm$ 32.00	85.35 $\pm$ 31.69

PAC III: proteína anticongelante do tipo III; iPMA: porcentagem de células com membrana plasmática e acrossomal intactas; MMP: potencial da membrana mitocondrial; iROS: níveis ROS intracelulares. Média  $\pm$  desvio padrão; a, b, c, d: letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ).

A adição de PAC III, nas concentrações de 1, 10 e 100  $\mu$ g/mL, nas amostras de espermatozoides obtidos do epidídimo de caprinos, e submetidos à congelação/descongelação, também não afetaram ( $P \geq 0,05$ ) o percentual de células espermáticas portadoras de alto potencial de membrana mitocondrial, bem como os níveis de espécies reativas de oxigênio, quando comparados ao grupo controle (sem adição de PAC III).

#### 4 Discussão

As PACs têm despertado interesse em pesquisas em áreas biomédicas, pois apresentam propriedades únicas, como anticongelantes biológicos. No entanto, poucos estudos avaliaram sua aplicação na criopreservação de sêmen e nenhum deles utilizou espermatozoides obtido a partir de epidídimo de bode (PROVESI e AMANTE, 2015). Embora os resultados de estudos anteriores tenham sugerido que há efeitos benéficos das PACs, a comparação direta entre eles é difícil porque, geralmente, são utilizadas diferentes condições experimentais. Fatores como o uso de diferentes tipos de proteína (I, II e III), além da origem do espermatozoide e das espécies empregadas, podem contribuir para a obtenção de resultados contraditórios. Neste trabalho, foram utilizados espermatozoides de bode obtidos a partir de

epidídimo e congelados em Tris-gema de ovo (5% glicerol), acrescidos por diferentes concentrações de PAC III, onde não houve diferença entre os grupos experimentais para os parâmetros de cinética, potencial de membrana mitocondrial e produção de ROS. A integridade de membrana plasmática e acrossomal de espermatozoides congelados com 100 µg/mL de PAC III foi menor que o grupo controle. Esses resultados diferem dos relatados na literatura para outras espécies.

Autores que utilizaram a PAC III para a congelação de sêmen de carneiros (CORREIA et al., 2021), chimpanzé (YOUNIS et al., 1998), búfalos (QADEER et al., 2014) e peixes (ZILLI et al., 2014) relataram aumento na motilidade e na proteção da membrana plasmática dos espermatozoides. Além disso, a suplementação com 1 µg / mL de PAC III, ao diluidor de congelação, melhorou a qualidade pós-descongelação dos espermatozoides de caprinos (LV et al., 2021).

A diferença acima relatada pode estar associada ao fato de que os espermatozoides epididimários não interagiram com as proteínas presentes no plasma seminal, que promovem alterações bioquímicas e atuam como decapacitantes (MOORE e HIBBIT, 1976; MOUSTAFA e MEZAROS, 1981). Isto pode justificar uma possível dificuldade do espermatozoide epididimário interagir com as proteínas anticongelantes, as quais são capazes de se ligar a canais iônicos, bloqueando e estabilizando a membrana plasmática dos espermatozoides (INGLIS et al., 2006).

Rubinsky et al. (1990) propuseram que as PACs podem atuar bloqueando canais iônicos, estabilizando os gradientes eletrolíticos transmembrana. De acordo com esta teoria, o influxo de cálcio seria diminuído, inibindo parcialmente o processo de capacitação. Os resultados controversos neste estudo, poderia ser devido às diferenças iônicas no fluído epididimário ou até mesmo na permeabilidade dos canais dessas células armazenadas no epidídimo (KUNKITTI et al., 2017).

As PACs interagem não apenas com os cristais de gelo, mas também com as superfícies celulares e soluto, durante a preservação em baixa temperatura (RUBINSKY e DEVRIES et al., 1989). Essas proteínas induzem histerese térmica, inibem a recristalização do gelo, reduzem a cinética de formação do gelo e influenciam sua morfologia (VENKETESH e DAYANANDA). É difícil prever as interações proteína-gelo com a membrana do espermatozoide, pois a proteína pode

sofrer mudanças conformacionais durante a variação de temperatura, perdendo sua capacidade de proteção (ANTSON et al., 2001).

O comprometimento à integridade da membrana plasmática e acrossomal dos espermatozoides caprinos pela PAC III, na concentração de 100 µg/mL, constatado nesse estudo, corrobora com os reportados por Zandiyeh et al. (2020). Esses autores, após a criopreservação de sêmen humano, relataram a ineficácia do uso da PAC III em concentrações acima de 10 µg/mL. Além disso, Koshimoto e Mazur (2002) demonstraram a diminuição na viabilidade espermática com o uso dessa proteína na concentração de 100 µg/mL em espermatozoides congelados de camundongos.

Parece que a menor proteção às membranas dos espermatozoides, após emprego de altas concentrações de PAC, está relacionada à sua ação nos canais iônicos, pela saída de água de dentro da célula em quantidade maior que a necessária para a criopreservação, promovendo o chamado “efeito solução”. Acreditava-se que, como as células foram colhidas da cauda do epidídimo, elas teriam passado pelas modificações na membrana plasmática para desenvolver sua motilidade potencial e então poderiam interagir com as PACs em maior concentração para desidratar as células.

O mecanismo de ação das PAC III nas membranas e no crescimento do cristal de gelo ocorre por meio da ligação à bicamada lipídica, que aumenta a temperatura de transição de fase das membranas, estabilizando-as (TOMCZAK et al., 2002; INGLIS et al., 2006). Entretanto, foi observado que o efeito protetor da proteína é espécie-dependente, com efeito benéfico em algumas espécies e prejudiciais em outras, devido a um possível efeito citotóxico (PAYNE et al., 1994; YOUNIS et al., 1998; PRATHALINGAM et al., 2006).

Comparando nossos resultados com os obtidos por outros autores, a falta de efeito crioprotetor da PACIII observada nos espermatozoides caprinos pode estar relacionada à diferença em sua interação com os componentes da membrana, com arranjos particulares de lipídios de cada espécie e temperaturas de transição de fase características. Além disso, a espécie caprina apresenta a membrana plasmática dos espermatozoides com maior grau de saturação e, no tocante ao espermatozoide epididimário, que não sofreu o segundo efluxo de colesterol, é possível que a interação da PAC III aos lipídios das membranas tenha resultado em estabilidade



durante a congelação. No entanto, este fato pode ter ativado a criocapacitação espermática no momento da descongelação, uma vez que, ao desorganizar a estrutura dos cristais, pode ter resultado em organização da membrana plasmática devido à descongelação, como distribuição das canoas de fosfolípidos e isto pode favorecer o efluxo de colesterol, pelo restabelecimento da temperatura, promovendo a reação acrossomal (IBORRA et al., 2000).

Os resultados da baixa sobrevivência espermática, devido às elevadas concentrações de PAC III (100 µg/mL), pode ser uma consequência da possível formação de gelo ao redor das células, e até mesmo devido à possível alteração da forma do cristal de dendrítico a bipiramidal (CARPENTER e HANSEN, 1992; CHAO et al, 1996). Esta afirmação se baseia no fato de que a PAC pode danificar as células congeladas por via mecânica, causando distorção da membrana celular e formação de gelo intracelular, decorrente de elevada concentração da PAC, resultando em cristais de gelo espiculares, cujo tamanho das espículas de gelo se assemelham ao das células (PHAM et al., 1990; KOUSHAFAR et al., 1997).

Estas condições da utilização da PAC que são espécie-específica e dose-dependente reforçam estudos anteriores, que, ao utilizarem concentrações menores (0,1 e 1 µg/mL) de PAC, obtiveram resultados satisfatórios (QADEER et al., 2014; ZILLI et al., 2014). Isso é evidente no relato de Qadeer et al. (2014), que observaram aumento na motilidade progressiva e integridade de membrana plasmática após congelação de sêmen de búfalos utilizando 0,1 µg/mL da PAC III, possivelmente devido à promoção da estabilização da membrana.

Além disso, Zilli et al. (2014), ao utilizarem a mesma concentração (0,1 µg/mL da PAC III), obtiveram melhor motilidade, viabilidade e VSL durante a congelação-descongelação de sêmen de peixes. Assim, as baixas concentrações (0,1 e 1 µg/mL) dessa proteína parecem ter mais sucesso, uma vez que as concentrações mais elevadas (10 e 100 µg/mL) alteram a permeabilidade iônica, estimulando a criocapacitação, resultando em menores percentuais de gametas portadores de membrana plasmática e acrossomal íntegras, além de poder ser tóxico para os espermatozoides (INGLIS et al., 2006).

Quanto ao potencial de membrana mitocondrial, foi observado que, embora sem diferença estatística, a adição da PAC III ao diluidor de congelação de sêmen caprino elevou numericamente o parâmetro em relação ao grupo controle.

A produção intracelular de ROS não foi alterada pela adição de PAC III nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL, em relação ao grupo controle. Existem condições em que os níveis de ROS não são afetados pela criopreservação (SOUZA et al., 2017), fato que foi demonstrado inclusive ao comparar o sêmen congelado-descongelado de algumas espécies com amostras de sêmen fresco (SANTIANI et al., 2014). Os efeitos crioprotetores do PAC III parecem não estar associados com a redução do estresse oxidativo, uma vez que nossos achados foram semelhantes aos descritos por Correia et al. (2021) e Lv et al. (2021).

A utilização da PAC III como aditivo ao diluidor de sêmen tem sido recomendada, com base em resultados favoráveis (YOUNIS et al., 1998; QADEER et al., 2014; ZILLI et al., 2014; CORREIA et al., 2021; LV et al., 2021). Contudo, os mecanismos de ação, dose adequada e sua provável interação com outros componentes presentes no diluente de espermatozoides caprinos, ainda precisam ser elucidados, principalmente sobre espermatozoides epididimários, sendo este um campo válido, que poderia aumentar a resposta da criopreservação, reforçando a necessidade de estudos mais detalhados.

Em conclusão, a adição da PAC III ao diluidor Tris-gema de ovo, usado para a congelação de espermatozoides obtidos do epidídimo de caprinos, não apresenta efeito sobre a cinética espermática, potencial de membrana mitocondrial e produção intracelular de ROS. No entanto, o uso de 100 µg/mL dessa proteína diminuiu o percentual de espermatozoides portadores de membrana plasmática e acrossomal intactas.

## 5 Referencias

AKHTER, S.; ANSARI, M.S.; ANDRABI, S.M.H; RAKHA, B.A.; ULLAH, N.; KHALID, M. Soya-lecithin in extender improves the freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 815 – 819, 2012.

ANTSON, A.A.; SMITH, D.J.; ROPER, D. I.; LEWIS, S.; CAVES, L.S.D.; VERMA, C.S.; BUCKLEY, S. L.; LILLFORD, P.J.; HUBBARD, R.E. Understanding the mechanism of ice binding by type III antifreeze proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 26, p. 875-889, 2001.

ARRUDA, L.C.P; ARAÚJO SILVA, R.A.J.; MONTEIRO, M.M.; SILVA R.P.F.; OLIVEIRA, A.S.; MERGULHÃO, F.C.C.; MONTEIRO JR, P.L.J; BATISTA, A.M.; GUERRA, M.M.P. Avaliação in vitro do sêmen congelado de carneiros com diluidor suplementado com miricetina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, p. 153-159, 2018.

BEIRÃO, J.; ZILLI, L.; VILELLA, S.; CABRITA E.; SCHIAVONE R.; HERRÁEZ M. Improving sperm cryopreservation with antifreeze proteins: effect on gilthead seabream (*Sparus aurata*) plasma membrane lipids. **Biology of Reproduction**, v. 86, p. 1–9, 2012.

CARPENTER, J.F.; HANSEN, T. N. Antifreeze protein modulates cell survival during cryopreservation: mediation through influence on ice crystal growth. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 89, p. 8953–8957, 1992.

CHAO, H.; DAVIES P.L.; CARPENTER, J.F. Effects of antifreeze proteins on red blood cell survival during cryopreservation. **Journal of Experimental Biology**, v. 199, p. 2071-2076, 1996.

CORREIA, L.F.L.; ESPIRITO-SANTO, C.G.; BRAGA, R.F.; et al. Addition of antifreeze protein type I or III to extenders for ram sperm cryopreservation. **Cryobiology**, v. 98, p. 194-200, 2021.

HAYS, L.M.; FEENEY, R.E.; CROWE, L.M.; CROWE, J.H.; OLIVER, A.E. Antifreeze glycoproteins inhibit leakage from liposomes during thermotropic phase transitions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 63 p. 6835-6840, 1996.

HOWARD, E. I.; BLAKELEY, M.F.; HAERTLEIN, M.; PETIT-HAERTLEIN, I.; MITSCHLER, A.; FISHER S.J.; COUSIDO-SIAH, A.; SALVAY, A.G.; POPOV, A.; MULLER-DIECKMANN, C.; PETROVA, T.; PODJARNY, A. Neutron structure of type-III antifreeze protein allows the reconstruction of AFP–ice interface. **Journal of Molecular Recognition**, v. 24, p. 724-732, 2011.

INGLIS, S.R.; TURNER, J.J.; HARDING, M.M. Applications of type I antifreeze proteins: studies with model membranes & cryoprotectant properties. **Current Protein e Peptide Science**, v. 7, p. 509-522, 2006.

IBORRA, A.; COMPANYÓ, M.; MARTÍNEZE, P.; MORROS, A. Cholesterol Efflux Promotes Acrosome Reaction in Goat Spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 2, p. 378-383, 2000.

KOUSHAFAR, H.; PHAM, L.; LEE, C.; RUBINSKY, B. Chemical adjuvant cryosurgery with antifreeze proteins. **Cryobiology**, v. 35, p. 324. 1997.

KOSHIMOTO, C.; MAZUR, P. Effects of warming rate, temperature, and antifreeze proteins on the survival of mouse sperm frozen at an optimal rate. **Cryobiology**, v. 45, p. 49–59, 2002.

KUMAR, R.; ATREJA, S.K. Effect of incorporation of additives in tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm tyrosine phosphorylation during cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 485-490, 2012.

LUVONI, G.C. Gamete cryopreservation in the domestic cat. **Theriogenology**, v. 66, p. 101–11, 2006.

LV, CHUNRONG; ALLAI Larbi; SAMEEULLAH Memon; JIACHONG Liang; XIANGWEI Fu; GUOQUAN Wu and GUOBO Quan. The Effects of Antifreeze Protein III

Supplementation on the Cryosurvival of Goat Spermatozoa During Cryopreservation. **Biopreservation and Biobanking**, v. 19, n. 4, 2021.

MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MENARD, M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the lowdensity lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1250 – 1258, 2002.

MOORE, H.D.M.; HIBBIT, K.C.S. The binding of labelled basic proteins by boar spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 46, p. 71-76, 1976.

MOUSTAFA, A.R.; MEZAROS, I. Interrelationship between the total protein content of bovine seminal plasma and behavior of spermatozoa after freezing-and-thawing. **Acta veterinaria academiae scientiarum Hungaricae**, v. 28, p. 403-408, 1981.

NISHIJIMA, K.; TANAKA, M.; SAKAI, Y.; KOSHIMOTO, C.; MORIMOTO, M.; WATANABE, T.; FAN, J.; KITAJIMA, S. Effects of type III antifreeze protein on sperm and embryo cryopreservation in rabbit. **Cryobiology**, v. 69, p. 22-25, 2014.

PAYNE, S.R.; OLIVER, J.E.; UPERTI, G.C. Effect of antifreeze proteins on the motility of ram spermatozoa, **Cryobiology**, v. 31, p. 180–184, 1994.

PEÑA, A.I.; BARRIO, M.; BECERRA, L.A.; QUINTELA, L.A.; HERRADON, P.G. Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. **Animal Reproduction Science**, v. 133, p. 214 – 223, 2012.

PHAM, L.; DAHIYA, R.; RUBINSKY, B. An in vivo study of antifreeze protein adjuvant cryosurgery. **Cryobiology**, v. 38, p. 169–175, 1999.

PRATHALINGAM, N.S; HOLT; W.V; REVELL, S.G.; MIRCZUK, S.; FLECK, R.A.; WATSON, P.F. Impact of antifreeze proteins and antifreeze glycoproteins on bovine sperm during freeze-thaw. **Theriogenology**, v. 66, p. 1894–1900, 2006.

PROVESI, J.G.; AMANTE, E.R. Carotenoids in pumpkin and impact of processing treatments and storage. **Processing and Impact on Active Components in Food**, p. 71-80, 2015.

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

QADEER,. S.; KHAN, M.A.; ANSARI, M.S.; RAKHA, B.A.; EJAZ, R.; HUSSNA, A.; ASHIQ, M.; IQBAL, R.; ULLAH, N.; AKHTER, S. Evaluation of antifreeze protein III for cryopreservation of Nili-Ravi (*Bubalus bubalis*) buffalo bull sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 148, p. 26-31, 2014.

RUBINSKY, B.; ARAV, A.; FLETCHER, G.L. Hypothermic protection--a fundamental property of "antifreeze" proteins. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 180, p. 566 – 571, 1991.

RUBINSKY, B.; ARAV, A; MATTIOLI, M; DEVRIES, A.L. The effect of antifreeze glycopeptides on membrane potential changes at hypothermic temperatures. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 173, p. 1369–1374, 1990.

RUBINSKY, B.; DEVRIES, A. L. Effects of ice crystal habit on the viability of glycerol protected red blood cells. **Cryobiology**, v. 26, p. 580, 1989.

SANTIANI, A.; EVANGELISTA, S.; SEPÚLVEDA, N.; RISOPATRON, J.; VILLEGAS, J.; SANCHEZ, R. Addition of superoxide dismutase mimics during cooling process prevents oxidative stress and improves semen quality parameters in frozen/thawed ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 82, p. 884-889, 2014.

SOUZA, H.M.; ARRUDA, L.C.P.; MONTEIRO, M.M.; NERY, I.H.V.; ARAUJO SILVA, R. A. J.; BATISTA, A.M.; GUERRA, M.M.P. The Effect of Canthaxanthin on the Quality of Frozen Ram Spermatozoa. **Biopreservation and Biobanking**, v. 15, 2016.

TOMCZAK, M.M.; HINCHA, D.K.; ESTRADA, S.D.; WOLKERS, W.F.; CROWE, L.M.; FEENEY, R.E.; TABLIN, F.; CROWE, J.H. A mechanism for stabilization of

membranes at low temperatures by an antifreeze protein. **Biophysical Journal**, v. 82, p. 874–881, 2002.

YOUNIS A.I.; ROOKS, B; KHAN, S; GOULD, K.G. The effects of antifreeze peptide III (AFP) and insulin transferrin selenium (ITS) on cryopreservation of chimpanzee (*Pan troglodytes*) spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 19, p. 207–214, 1998.

VENKETESH, S; DAYANANDA, C. Properties, potentials, and prospects of antifreeze proteins. **Critical Reviews Biotechnology**, v. 28, p. 57–82, 2008.

VILELA, C.G.; MARQUEZ, J.M; GRAHAM, J.K; BARFIELD, J.P. Cryopreservation of bison epididymal sperm: a strategy for improving post-thaw quality when collecting sperm in field conditions. **Theriogenology**, v. 89, p. 155–161, 2017.

WANG, J.H. A Comprehensive Evaluation of the Effects and Mechanisms of Antifreeze Proteins during Low-Temperature Preservation. **Cryobiology**, v. 41, p. 1-9, 2000.

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

ZANDIYEH, S; SHAHVERDI, A.; EBRAHIMI, B.; SABBAGHIAN, M. A novel approach for human sperm cryopreservation with AFPIII. **Reproduction Biology**, v. 20, p. 169-174, 2020.

ZILLI, L.; BEIRÃO, J.; SCHIAVONE, R.; HERRAEZ, M.P.; GNONI, A.; VILELLA, S. Comparative Proteome Analysis of Cryopreserved Flagella and Head Plasma Membrane Proteins from Sea Bream Spermatozoa: Effect of Antifreeze Proteins. **PlosOne**, v. 9, p. 6, 2014.

## 5.2 Artigo 2

**Proteína anticongelante do tipo III adicionada em diferentes diluidores de criopreservação de sêmen caprino**

***Type III antifreeze protein added in different goat semen cryopreservation extenders***

Millena Maria MONTEIRO<sup>1\*</sup>, Desirée Coelho de Mello SEAL<sup>1</sup>, Jerônimo Hugo de SOUZA<sup>1</sup>, Lúcia Cristina Pereira ARRUDA<sup>1</sup>, Lucas Eduardo Bezerra de LIMA<sup>3</sup>; Regina Célia Bressan Queiroz de FIGUEIREDO<sup>3</sup>, Sildivane Valcácia SILVA<sup>2</sup> e Maria Madalena Pessoa GUERRA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Andrologia, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, Pernambuco, Brasil;

<sup>2</sup>Departamento de Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, Paraíba, Brasil.

<sup>3</sup>Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular, Departamento de Microbiologia, Instituto Aggeu Magalhaes- Fiocruz, Recife, Brasil

**\*Autor para correspondência:** M. M. Monteiro, Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE. Brasil. Tel: +55 81 3320 6412, Fax: 3320 6057. E-mail: millena.vet@gmail.com.



## Resumo

Objetivou-se investigar o efeito da suplementação da proteína anticongelante do tipo III (PACIII) em diferentes diluidores de congelação de sêmen caprino. Seis *pools* de sêmen, obtidos de quatro reprodutores caprinos, foram congelados em diluidor à base de tris-gema de ovo (TGO; Experimento 1) ou diluidor à base de leite desnatado (LD; Experimento 2), ambos suplementados com PAC III (0; 1; 10; 100 µg/mL). Após a descongelação (37 °C/30 s), avaliou-se cinética (CASA), viabilidade (integridade de membrana plasmática – iMP, e integridade de membrana acrossomal – iMA por microscopia de fluorescência), e ultraestrutura espermática por meio de microscopia eletrônica de varredura. Nos experimentos 1 e 2 não houve diferença ( $P \geq 0,05$ ) entre os grupos experimentais para os parâmetros de cinética e viabilidade espermática. Os resultados da avaliação ultraestrutural demonstraram que a adição da PAC III causou danos na membrana plasmática localizada na cabeça e na região do colo espermático. Conclui-se que, nas condições deste experimento, a adição da PAC III aos diluidores à base de tris-gema de ovo e leite desnatado, utilizados para criopreservação do sêmen caprino, não apresenta efeito positivo sobre a ultraestrutura dos espermatozoides caprinos submetidos a congelação/descongelação.

**Palavras-chave:** *Bode; espermatozoide; cinética espermática; cristais de gelo; microscopia.*

## 1 Introdução

As tecnologias reprodutivas são fundamentais para o crescimento da caprinocultura mundial (PURDY et al., 2009), como a inseminação artificial (IA) e a criopreservação seminal, que reforçam a necessidade de desenvolver protocolos que melhorem a eficiência da IA com o uso de sêmen pós-descongelação. Nesse sentido, as principais mudanças estão relacionadas à congelação de sêmen, por ser o principal método de preservação espermática por tempo indeterminado (SANTIAGO-MORENO et al., 2011).

O processo de criopreservação pode causar danos irreversíveis às mitocôndrias, membranas plasmáticas e acrossomais dos espermatozoides,

comprometendo a viabilidade celular. Esses danos podem ser causados por mudanças de temperatura, formação de cristais de gelo e toxicidade do diluidor (WATSON, 1995; PURDY, 2006). Dessa forma, investiga-se o aperfeiçoamento das curvas de refrigeração/congelamento, a natureza química dos diluidores e os mecanismos de crioproteção, como a suplementação dos diluidores com agentes antioxidantes e/ou com agentes crioprotetores intra ou extracelulares, seja de natureza lipídica ou proteica, como é o caso das proteínas anticongelantes (PAC) (PROVESI; AMANTE, 2015).

A PAC é uma classe de peptídeos capaz de interagir e influenciar no crescimento do núcleo inicial dos cristais de gelo, na redução do ponto de congelamento da água, bem como na inibição da recristalização; (DE VRIES et al., 1970; DE VRIES, 1988). São conhecidos cinco membros que compõem a família das proteínas anticongelantes (PACI, PACII, PACIII, PACIV e GPAC), mas apenas três estão disponíveis comercialmente (PACI, PACIII e GPAC) (PROVESI; AMANTE, 2015).

A PAC III vem sendo estudada com resultados promissores como agente crioprotetor em espermatozoides de diferentes espécies, como chimpanzés (YOUNIS et al., 1998), búfalos (QADEER et al., 2014), peixes (ZILLI et al., 2014), ovinos (CORREIA et al., 2021) e caprinos (LV et al., 2021). Por isso, formulamos a hipótese de que a suplementação da PAC III em diferentes diluidores de congelamento de sêmen caprino poderia aprimorar e elucidar a ação desta proteína na célula espermática.

Assim, o objetivo desse estudo foi investigar *in vitro* o efeito da adição da PAC III na qualidade pós-descongelamento espermática, bem como possíveis interações desta proteína com os diluidores tradicionais da criopreservação do sêmen caprino.

## **2 Material e Métodos**

Todos os procedimentos experimentais foram realizados após aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), licença nº 110/2019.

## 2.1 Reagentes

Os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A solução estoque da proteína anticongelante III (PACIII -1 M) foi preparada em DMSO e armazenada a -20 °C.

## 2.2 Animais, colheita de sêmen e avaliação do sêmen fresco

Quatro bodes Saanen, sexualmente maduros, alimentados com feno de Tifton, ração comercial peletizada (400 g/dia), sal mineral e água *ad libitum* foram utilizados neste estudo. Amostras de sêmen foram obtidas utilizando o método de vaginal artificial, com uma fêmea como manequim. Seis ejaculados foram obtidos de cada animal, em dias alternados, totalizando 24 ejaculados. Imediatamente após a colheita, as amostras foram avaliadas subjetivamente quanto a turbilhonamento, motilidade e vigor espermático, sob microscópio de contraste de fase (Olympus, Japão, 100x). Os ejaculados que apresentaram valores mínimos de 70% de motilidade total foram aprovados e destinadas à formação do *pool*. Em seguida, a concentração espermática foi determinada utilizando-se a câmara de Neubauer e a motilidade espermática do *pool* foi analisada no sistema computadorizado de análise de espermatozoides (CASA, SCATM; Microptics, S.L., Versão 5.1, Barcelona, Espanha).

## 2.3 Criopreservação do sêmen

O *pool* de sêmen foi submetido duas vezes ao processo de lavagem com tampão TRIS (3,605 g Tris, 2,024 g de ácido cítrico, 1.488 g de frutose, 100 mL de água MilliQ, pH 6,8), por centrifugação (600 g/10 min), para remoção de plasma seminal. Dois experimentos foram realizados. No experimento 1, foi utilizado o diluidor à base de Tris-gema de ovo (TGO: 3,786 g de Tris; 2,172 g de ácido cítrico; 0,625 g de frutose; 20% de gema de ovo; 100 mL de água ultrapura; 5% de glicerol, pH 6,8). Para o experimento 2, foi utilizado o diluidor à base de leite desnatado (LD: 10 g leite em pó desnatado; 0,0194 g glicose; 100 mL de água ultrapura; 5% glicerol, pH 6,8). Em ambos os experimentos a concentração final do sêmen diluído foi de  $200 \times 10^6$

espermatozoides/mL. Após diluição, foram formados os grupos experimentais e foram suplementados com diferentes concentrações de PAC III (0, 1, 10 e 100 µg/mL).

A seguir, as amostras foram envasadas em palhetas (0,25 mL), identificadas por grupo, e congeladas em sistema automatizado (TK Tecnologia em Congelação Ltda, Uberaba, Brasil). Foi utilizada curva de refrigeração de  $-0,25$  °C/min, iniciando à temperatura ambiente (27 °C). Após atingir 5 °C, as amostras de sêmen foram submetidas ao período de estabilização durante 120 minutos e, logo após este período, foi iniciada a curva de congelação com diminuição de  $-15$  °C/min, até chegar a  $-120$  °C. Em seguida, as palhetas foram estocadas em nitrogênio líquido ( $-196$  °C).

#### *2.4 Descongelação e avaliação do sêmen*

Duas palhetas de sêmen de cada grupo experimental foram descongeladas (37 °C/30 s), agrupadas e submetidas às avaliações, após cinco minutos de incubação a 37 °C.

##### *2.4.1 Análise da cinética espermática*

Alíquotas (10 µL) de sêmen foram diluídas nos respectivos diluidores (sem glicerol) para a concentração de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL e incubadas em banho-maria (37 °C/15 min). A avaliação da cinética espermática foi realizada no sistema CASA. Uma alíquota (10 µL) da amostra diluída foi depositada sobre uma 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™ A312FC, Alemanha). Para cada amostra, cinco campos aleatórios foram selecionados, com pelo menos 500 espermatozoides registrados. As variáveis analisadas foram: motilidade total (MT,%), motilidade progressiva (MP,%), linearidade (LIN,%), retilinearidade (STR,%), índice de oscilação (WOB,%), velocidade curvilínea (VCL, µm/s), velocidade em linha reta (VSL, µm/s), velocidade média da trajetória (VAP, µm/s), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH, µm/s), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF, Hz). Os valores do CASA foram medidos com as

seguintes configurações: temperatura, 37 °C; ampliação, 100x; número de imagens, 25; fotos por segundo, 25; área da cabeça, 20 a 70 µm<sup>2</sup>; 50% LIN.

#### 2.4.2 Análise por microscopia de epifluorescência

As análises de integridade de membrana plasmática (iMP) e integridade de acrossoma (iMA) foram realizadas por meio de microscopia de epifluorescência (x400; Carl Zeiss, Gottingen, Germany). A iMP foi avaliada pelo método de dupla coloração, utilizando os fluorocromos diacetato de carboxifluoresceína (CFDA; 0,46 mg/mL em DMSO) e iodeto de propídio (IP; 0,5 mg/mL em PBS). Para cada tratamento, uma alíquota (30 µL) da amostra foi corada com 5,0 µL de CFDA e 5,0 µL IP, incubada por 10 min (25 °C). Um total de 200 espermatozoides foram avaliados usando filtro de excitação DBP 485/20 nm e filtro de emissão de 580-630 nm.

A avaliação da integridade de membrana acrossomal (iMA) foi realizada utilizando o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína conjugado a *Peanut agglutinin* (FITC-PNA; 100 µg/mL em PBS). Para cada tratamento, uma alíquota (10 µL) da amostra foi utilizada para confecção de estirado, que, após seco ao ar, foi corado com 20µL de FITC-PNA e incubado em câmara úmida (4 °C) por 20 minutos, no escuro. Posteriormente, as lâminas foram imersas em TRIS tampão, duas vezes, e secas naturalmente. Imediatamente antes da avaliação, 5,0 µL do meio de montagem (4,5 mL de glicerol, 0,5 mL PBS e 5,0 mg de p-fenilediamine) foram colocados na lâmina e cobertos com lamínula. Ao todo, 200 espermatozoides por lâmina foram avaliados sob imersão, utilizando filtro de emissão LP 515 nm e filtro de excitação BP 450-490 nm. A integridade acrossomal é avaliada segundo a coloração observada em microscopia, com a utilização do FITC-PNA (SILVA; GUERRA, 2012). Os espermatozoides com acrossoma intacto fluorescem em verde brilhante, e os espermatozoides com acrossoma reagidos coram em verde por toda extensão da cabeça (ROTH et al., 1998).

#### 2.4.3 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura

Para análise ultraestrutural, amostras dos grupos de ambos os experimentos foram lavadas três vezes em tampão fosfato salino (PBS; pH 7,2) e fixadas por 2 horas a 25 °C em solução contendo 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído

em tampão cacodilato a 0,1 M (solução de Karnovsky; pH 7,2). Em seguida, as células foram lavadas três vezes em PBS e pós-fixadas por 1 hora em solução a 1% de tetróxido de ósmio a 0,8%, ferricianeto de potássio a 5 mM e CaCl<sub>2</sub> em 0,1 M de tampão cacodilato, por 30 minutos, no escuro. As células foram lavadas mais três vezes em PBS, aderidas com poli-L-lisina em lamínulas, desidratadas gradativamente em solução de etanol (etanol a 7, 15, 30, 50, 70, 90 e 100%), submetidas ao ponto crítico no aparelho HCP-2 Critical Point Dryer (Hitachi, Tokyo, Japan) e metalizadas com uma camada de ouro de, aproximadamente, 20 nm. As imagens foram geradas pelo microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-.5600LV (JEOL, Tokyo, Japan). Foi realizada uma avaliação descritiva das estruturas espermáticas. Na cabeça, o acrossoma e membrana plasmática foram analisados. Na cauda, foi observada a peça intermediária.

## *2.5 Análises estatísticas*

Os grupos experimentais foram testados para a normalidade, usando o Teste Shapiro-Wilk. Em seguida, as variáveis paramétricas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) unilateral, seguida do teste de Tukey. As variáveis não paramétricas foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Os dados foram expressos como média  $\pm$  SD (desvio padrão) e foram considerados significativos se  $P < 0.05$ . As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se a versão GraphPad Prism8 (Version 8.0.1).

## **3. Resultados**

### *3.1 Experimento 1*

O efeito da adição de PAC III ao diluente Tris-gema de ovo na congelação de sêmen de caprinos foi investigado.

#### 3.1.1 Avaliação da cinética espermática e integridade celular

Não houve diferença ( $P > 0.05$ ) nos parâmetros cinéticos (MT, MP, LIN, STR, WOB, VCL, VSL, VAP, ALH e BCF) dos espermatozoides pós-descongelados dos

grupos tratados com PAC III em relação ao grupo controle (Tabela 1).

**Tabela 1.** Valores médios dos parâmetros cinéticos de espermatozoides caprinos, após congelação em diluidor à base de Tris-Gema de ovo, adicionado de diferentes concentrações (0, 1, 10 e 100 µg/ml) de PAC III

Variáveis	PAC III (µg/ml)			
	0	1	10	100
MT (%)	50.43±12.89	48.41±6.87	54.56±15.56	51.66±14.07
MP (%)	27.99±8.51	30.39±5.17	32.74±8.99	33.34± 9.20
LIN (%)	73.70±13.96	73.84± 5.52	73.41±4.31	73.76±4.49
STR (%)	86.97± 7.83	89.46±3.24	88.06±3.48	88.83±2.63
WOB (%)	84.03±9.73	82.46± 3.83	83.37±3.17	79.69±9.68
VCL (µm/s)	66.26±9.20	76.39±8.63	73.53±10.97	78.40±11.44
VSL (µm/s)	47.97±6.76	56.30±6.64	53.81±7.79	57.67±8.44
VAP (µm/s)	56.11±5.27	62.89±6.71	61.19±8.72	65.01±9.90
ALH (µm/s)	1.90±0.57	2.34±0.35	2.23±0.33	2.30±0.37
BCF (Hz)	9.41±2.17	11.71±1.18	11.26±1.58	11.23±1.85

PAC III – proteína anticongelante do tipo III; MT – motilidade total; MP – motilidade progressiva; LIN - linearidade; STR - retilinearidade; WOB: índice de oscilação; VCL – velocidade curvilínea, VSL – velocidade em linha reta; VAP – velocidade média da trajetória; ALH- amplitude de deslocamento lateral da cabeça; BCF - frequência de batimento flagelar.

Quanto a integridade de membrana plasmática e integridade de membrana acrossomal também não foi observada diferença ( $P > 0.05$ ) entre os grupos controle e os tratados com PAC III (Tabela 2).

**Tabela 2.** Percentual de espermatozoides caprinos portadores de membrana plasmática (iMP) e membrana acrossomal (iAC) integras, após congelação em diluidor à base de Tris-gema de ovo, adicionado de diferentes concentrações (0,1, 10 e 100 µg/ml) de PAC III e avaliados em microscopia de epifluorescência

Variáveis	PAC III (µg/ml)			
	0	1	10	100
iMP (%)	38.07±11.05	38.14±8.91	46.86±19.56	38.23±7.13
iMA (%)	20.29±5.23	20.00±6.63	24.17±11.72	21.00±5.00

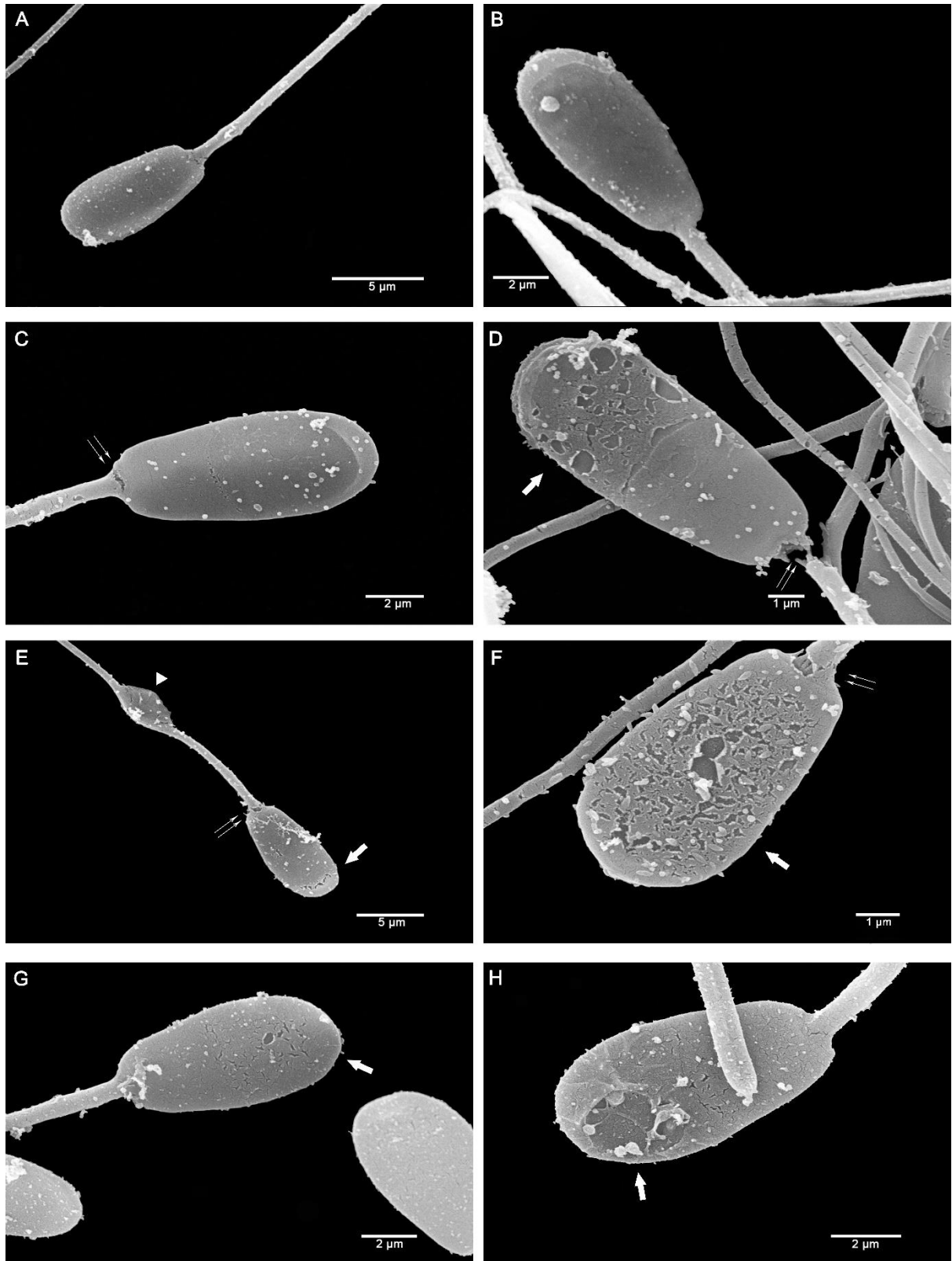
PAC III: proteína anticongelante do tipo III; iMP: porcentagem de células com a membrana plasmática íntegras; iMA: potencial de células com a membrana acrossomal integras.

### 3.1.2 Avaliação da ultraestrutura por microscopia eletrônica de varredura

A análise através da microscopia eletrônica de varredura evidenciou danos na membrana plasmática dos espermatozoides caprinos congelados em diluidor à base de Tris-gema de ovo, suplementado com PAC III.

A análise dos espermatozoides do grupo controle (0 µg/mL; Figuras 1A e 1B) evidenciou a membrana plasmática intacta, enquanto nas amostras dos grupos tratados com diferentes concentrações (1, 10 ou 100 µg/mL) de PAC III (Figuras 1C, 1E e 1G, respectivamente), foram observados danos erosivos na membrana plasmática na região da cabeça espermática e danos localizados na região do colo, em espermatozoides dos grupos suplementados com 1 e 10 µg/mL de PAC III (Figuras 1D e 1F, respectivamente).





**Figura 1.** Espermatozoides caprinos, após congelação em diluidor Tris-gema de ovo, adicionado de diferentes concentrações de PAC III, avaliados em microscópio eletrônico de varredura. A e B) espermatozoides sem PAC III, com membranas plasmáticas íntegras; C e D) espermatozoides com 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de PAC III com lesão (dupla  $\rightarrow$ ) na membrana plasmática; E e F) espermatozoides com 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de PAC III com descamação e fissura (seta grossa) da membrana plasmática; G e H) espermatozoides com 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de PAC III com descamação intensa e danos erosivos na membrana plasmática (seta grossa).

## 3.2 Experimento 2

Neste experimento, a adição de PAC III ao diluidor à base de Leite desnatado para congelação de sêmen de caprinos foi avaliada.

### 3.2.1 Avaliação da cinética espermática e integridade celular

O grupo acrescido de 1 µg/mL de PAC III apresentou menor ( $P<0.05$ ) MP que o grupo tratado com 100 µg/mL de PAC III, porém, sem diferir dos demais grupos. Não houve diferença ( $P>0.05$ ) para os demais parâmetros cinéticos (MT, MP, LIN, STR, WOB, VCL, VSL, VAP, ALH e BCF) entre os grupos avaliados (Tabela 3).

**Tabela 3.** Valores médios dos parâmetros cinéticos de espermatozoides caprinos, após congelação em diluente à base de Leite desnatado, adicionado de diferentes concentrações (0, 1, 10 e 100 µg/ml) de PAC III

Variáveis	PAC III (µg/ml)			
	0	1	10	100
MT (%)	45.23±7.99	35.77±6.73	39.83±5.93	48.98±10.78
MP (%)	20.40±4.83 <sup>AB</sup>	13.33±1.36 <sup>B</sup>	19.53±6.95 <sup>AB</sup>	23.97± 5.27 <sup>A</sup>
LIN (%)	61.10±7.97	61.25± 9.27	62.58±9.46	64.50±6.31
STR (%)	78.55± 5.93	78.87±7.29	81.00±6.75	82.27±3.81
WOB (%)	77.50±4.72	77.35±4.87	76.97±6.66	78,28±4.76
VCL (µm/s)	97.92±20.92	79.33±16.26	85.40±13.02	86.02±14.23
VSL (µm/s)	58.88±10.16	48.03±9.00	53.37±11.07	55.30±9.09
VAP (µm/s)	75.47±14.78	61.23±12.28	65.93±12.42	67.30±11.42
ALH (µm/s)	3.10±0.61	2.70±0.45	2.88±0.44	2.70±0.40
BCF (Hz)	11.23±1.00	10.42±1.25	11.42±1.82	10.92±1.49

PAC III – proteína anticongelante do tipo III; MT – motilidade total; MP – motilidade progressiva; LIN - linearidade; STR - retilinearidade; WOB: índice de oscilação; VCL – velocidade curvilínea, VSL – velocidade em linha reta; VAP – velocidade média da trajetória; ALH- amplitude de deslocamento lateral da cabeça; BCF - frequência de batimento flagelar. <sup>A</sup>, <sup>B</sup>: letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ).

Para integridade de membranas plasmática e acrossomal nenhum efeito protetor ( $P>0.05$ ) foi observado com a adição de PAC III ao diluente leite desnatado usado na congelação do sêmen caprino (Tabela 4).

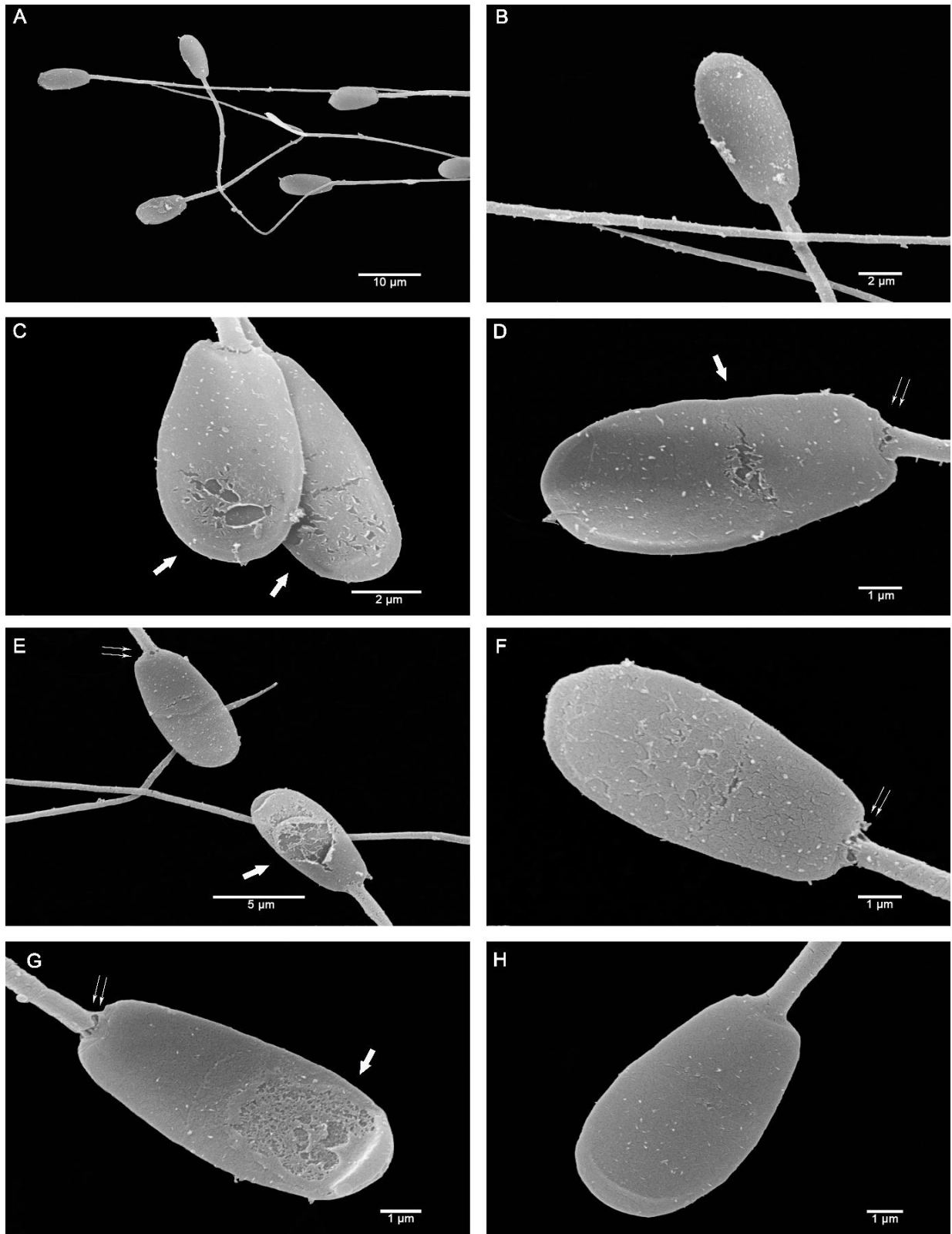
**Tabela 4.** Percentuais de espermatozoides caprinos com membrana plasmática (iMP) e membrana acrossomal (iMA) íntegras, pós-congelação em diluente à base de leite desnatado, adicionado de diferentes concentrações (0, 1, 10 e 100 µg/mL) de PAC III e avaliados em microscopia de epifluorescência

Variáveis	PAC III (µg/mL)			
	0	1	10	100
iMP (%)	44.95±8.16	38.14±8.91	46.86±19.56	38.23±7.13
iMA (%)	28.35±4.66	31.60±7.96	36.00±14.91	29.50±12.77

PAC III: proteína anticongelante do tipo III; iMP: porcentagem de células com a membrana plasmática íntegra; iMA: porcentagem de células com a membrana acrossomal íntegra.

### 3.2.2 Avaliação da ultraestrutura por microscopia eletrônica de varredura

A avaliação através da microscopia eletrônica de varredura evidenciou danos extensos à membrana plasmática, tanto na região da cabeça quanto do colo, dos espermatozoides caprinos congelados em diluidor à base de leite desnatado, suplementado com diferentes concentrações PAC III (Figura 2). A análise dos espermatozoides do grupo controle (0 µg/mL; Figuras 2A e 2B) evidenciou a membrana plasmática intacta, enquanto nas amostras dos grupos tratados com diferentes concentrações (1, 10 e 100 µg/mL) de PAC III (Figuras 2C, 2D, 2E, 2F, 2G e 2H, respectivamente). Foram observados danos erosivos na membrana plasmática localizada na cabeça dos espermatozoides e danos localizados na região do colo (Figuras 2D, 2E, 2F e 2G).



**Figura 2.** Espermatozoides caprinos, pós-congelação em diluidor à base de Leite Desnatado, adicionado de diferentes concentrações de PAC III, avaliados em microscópio eletrônico de varredura. A e B) espermatozoides sem PAC III, com membranas plasmáticas íntegras; C e D) espermatozoides com 1 µg/mL de PAC III com lesão (dupla →) na membrana plasmática; E e F) espermatozoides com 10 µg/mL de PAC III com descamação e fissura (seta grossa) da membrana plasmática; G e H) espermatozoides com 100 µg/mL de PAC III com descamação intensa e danos erosivos na membrana plasmática (seta grossa).

## 4 Discussão

Este estudo considerou os efeitos da adição do PAC III na congelação de espermatozoides caprinos, com foco na qualidade pós-descongelamento e avaliação ultraestrutural. Concentrações diferentes de PAC III foram avaliadas e foi demonstrado que a sua adição, independente da concentração e do diluidor testado, causou danos às membranas espermáticas.

Os resultados do presente estudo foram contrários a outros autores que mostraram efeitos estimulantes da adição desta proteína sobre a motilidade dos espermatozoides, onde a suplementação de PAC I e III (0,1 µg/mL, 1 µg/mL e 10 µg/mL) em diluidor de sêmen de peixes, determinou efeitos positivos na motilidade e na velocidade pós-descongelamento, especialmente com PAC III (SHALIUTINA-KOLESOVA et al., 2019), resultados semelhantes foram obtidos em peixes com a adição de 10 µM de PAC III (ABED-EKMDOUST et al., 2017). Considerando a espécie utilizada, é importante ponderar que o espermatozoide de peixe apresenta condições diferentes para a criopreservação, quando comparado ao espermatozoide de mamíferos, como o caprino, pois apresentam maior necessidade de crioprotetores penetrantes, variando entre 10% a 20% da solução (CHE-ZULKIFLI et al., 2018), que alteram a propriedade coligativa da água e favorecem a desidratação celular.

Outra condição observada foi a redução das concentrações de crioprotetores penetrantes e a associação com a PAC III, como relatam Hossen et al. (2021). Estes autores verificaram que a adição de 10 µg/mL de PAC III, associada a 8% de dimetilsulfóxido, pode criopreservar eficientemente espermatozoides de moluscos, ou seja, redução da quantidade de DMSO comumente utilizada, que é de 10%.

É importante considerar que as proteínas anticongelantes possuem afinidade de ligação ao gelo e são capazes de reduzir a temperatura de congelação de uma solução de forma não coligativa, com influência negativa em sua temperatura de fusão, fenômeno conhecido como histerese térmica (TH). Além disso, tem interação do diluidor suplementado com PAC III aos canais iônicos, que estabiliza os gradientes eletrolíticos transmembrana (FLORES et al., 2018). Assim, a célula desidrata e os cristais de gelo são formados na região extracelular.

Os diluidores testados nos dois experimentos possuem glicerol, um álcool que promove modificação da propriedade coligativa. Porém, não houve redução da quantidade comumente usada deste crioprotetor penetrante para a adição da PAC III, o que pode ter acentuado o processo de desidratação celular, previamente à congelação, formando cristais de gelo extracelulares.

Em experimentação realizada com hemácias, Ishiguro e Rubinsky (1994) observaram que a adição de PAC promoveu desidratação celular, porém modificou a formação dos cristais de gelo para um formato de espículas. Quanto maior a concentração de PAC, maior o tamanho das espículas e a destruição celular. Desta forma, acredita-se que o mesmo comportamento observado em hemácias ocorreu com a célula espermática caprina, ou seja, o glicerol promoveu a desidratação celular e a PAC III organizou os cristais de gelo em formato de espículas, que danificaram a membrana plasmática, justificando as alterações observadas na microscopia eletrônica de varredura.

Os estudos de Lv et al. (2021) demonstraram que a adição de PAC III ao diluente de congelação melhorou a qualidade pós-descongelação do sêmen caprino, com a concentração de 1 µg/mL. Porém, nas maiores (10, 50 e 100 µg/mL) concentrações de PAC III foram observadas menor efeito crioprotetor. Estes estudos corroboram com os observados em nosso experimento, pois não foi observada diferença entre os parâmetros de integridade celular entre os grupos tratados e o controle, quando utilizadas as sondas fluorescentes. No entanto, as lesões observadas na MEV podem indicar lesões subletais, que podem comprometer a função espermática.

Considerando outras espécies, Zandiyeh et al. (2020), após a criopreservação de sêmen humano, relataram a falta de efeito da PAC III em concentrações acima de 10 µg/mL. Koshimoto e Mazur (2002) demonstraram a diminuição na viabilidade espermática com o uso da proteína na concentração de 100 µg/mL em espermatozoides congelados de camundongos. Lv et al. (2021) demonstraram que a adição de 1 µg/mL de PAC III em amostras de sêmen caprino foi mais viável, e acima desse valor não teve efeito protetor. Assim, mostrou que a menor proteção às membranas dos espermatozoides após uso de altas concentrações (10, 50 e 100 µg/mL) de PAC parecem estar relacionadas ao aumento de danos.

A concentração de 100 µg/mL não otimiza o uso da PAC III. No presente estudo, as concentrações de PAC III utilizadas são semelhantes às utilizadas anteriormente (LV et al., 2021). No entanto, combinação com outros componentes do diluidor, diferentes tipos de PAC, bem como concentrações mais altas de PAC que poderiam aumentar a resposta da atividade protetora na criopreservação, reforça a necessidade de estudos mais detalhados. Isso poderia ser uma perspectiva de futuro, visto que cada diluidor possui uma composição diferente que pode atuar e interagir com as proteínas sobre mecanismos diferentes (ANTSON et al., 2001). Neste caso, considerar a redução da concentração de crioprotetores penetrantes, como os estudos na criopreservação de espermatozoides de moluscos.

A avaliação ultraestrutural para estudar o efeito da adição da PAC em diferentes diluidores na congelação de sêmen ainda não tinha sido demonstrado. Entretanto, neste estudo a adição da PAC III causou danos erosivos na membrana plasmática localizada na cabeça dos espermatozoides e danos localizados na região do colo dos espermatozoides. Tais danos celulares podem ter ocorrido pela capacidade das PACs interagirem com os cristais de gelo, com as superfícies celulares e com os solutos, durante a preservação em baixa temperatura (RUBINSKY; DEVRIES et al., 1989).

No entanto, não se sabe como ocorrem essas interações entre a proteína e o gelo com a membrana desta célula, pois a proteína pode sofrer mudanças conformacionais durante a variação de temperatura e perder sua capacidade protetora (ANTSON et al., 2001). É sabido que as proteínas agem através da adsorção de suas superfícies planas de ligação ao gelo sobre os planos específicos dos cristais de gelo, inibindo ou prevenindo o crescimento posterior do gelo (FLORES et al., 2018), mas esse mecanismo na crioproteção ao espermatozoide ainda não é bem elucidado.

Em conclusão, a adição de PAC III aos diluidores a base de Tris-gema de ovo e leite desnatado, usados para a congelação de sêmen, não apresenta efeito positivo sobre a cinética espermática e integridade de membrana plasmática e acrossomal. Além disso, a adição da PAC III causa danos erosivos à membrana plasmática localizada na cabeça dos espermatozoides e danos localizados na região do colo.

## Referências

ABED-ELMDOUST, A.; FARAHMAND, H.; MOJAZI-AMIRI, B.; RAFIEE, G.; RAHIMI, R. A nova vitrificação de gotículas combinada com a proteína anticongelante de peixe tipo III aumenta a crioproteção do sêmen no esturjão persa selvagem em perigo de extinção *Acipenser persicus* (Borodin, 1897). **Aquaculture Research**, v. 46, p. 2392–2397, 2015.

ANTSON, A.A.; SMITH, D.J.; ROPER, D. I.; LEWIS, S.; CAVES, L.S.D.; VERMA, C.S.; BUCKLEY, S. L.; LILLFORD, P.J.; HUBBARD, R.E. Understanding the mechanism of ice binding by type III antifreeze proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 26, p. 875-889, 2001.

CHE-ZULKIFLI, C.I.; KOH, I.C.C.; SHAHREZA, M.S.; IKHWANUDDIN, M. Cryopreservation of spermatozoa on grouper species: a review. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, p. 26-32, 2020.

CORREIA, L.F.L; ESPIRITO-SANTO, C.G.; BRAGA, R.F., et al. Addition of antifreeze protein type I or III to extenders for ram sperm cryopreservation. **Cryobiology**, v. 98, p. 194-200, 2020.

DE VRIES, A.L.; KOMATSU, S.K.; FEENEY, R.E. Chemical and Physical properties of freezing pointdepressing glycoproteins from Antarctic fishes. **Journal of Biological Chemistry** , v. 245, p. 2901–2908, 1970.

DE VRIES, A.L. The role of antifreeze glycoproteins and peptides in preventing Antarctic fish from freezing. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 90, p. 611–621, 1988.

FLORES, A.; QUON, J.C.; PEREZ, A.F.; YONG, B. Mechanisms of antifreeze proteins investigated via the site-directed spin labeling technique. **European Biophysics Journal**, v. 47, p. 611-630, 2018.



HOSSEN, S.; SHARKER, M.R.; CHO, Y.; SUKHAN, Z.P.; KHO, K.H. Effects of Antifreeze Protein III on Sperm Cryopreservation of Pacific Abalone, *Haliotis discus hannai*. **International Journal of Molecular Science**, v. 22, n. 8, p. 3917, 2021.

ISHIGURO, H.; RUBINSKY, B. Mechanical interactions between ice crystals and red blood cells during directional solidification. **Cryobiology**, v. 31, n. 5, p. 483-500, 1994.

KOUSHAFAR, H.; PHAM, L.; LEE, C.; RUBINSKY, B. Chemical adjuvant cryosurgery with antifreeze proteins. **Cryobiology**, v. 35, p. 324. 1997.

KOSHIMOTO, C.; MAZUR, P. Effects of warming rate, temperature, and antifreeze proteins on the survival of mouse sperm frozen at an optimal rate. **Cryobiology**, v. 45, p. 49–59, 2002.

LV, C.; ALLAI, L.; SAMEEULLAH, M.; JIACHONG, L.; XIANGWEI, F.; GUOQUAN, W.; GUOBO, Q. The Effects of Antifreeze Protein III Supplementation on the Cryosurvival of Goat Spermatozoa During Cryopreservation. **Biopreservation and Biobanking**, v. 19, n. 4, 2021.

YOUNIS A.I.; ROOKS, B.; KHAN, S.; GOULD, K.G. The effects of antifreeze peptide III (AFP) and insulin transferrin selenium (ITS) on cryopreservation of chimpanzee (*Pan troglodytes*) spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 19, p. 207–214, 1998.

PROVESI, J.G.; AMANTE, E.R. Carotenoids in pumpkin and impact of processing treatments and storage. **Processing and Impact on Active Components in Food**, p. 71-80, 2015.

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

PURDY, P.H.; SONG, Y.; SILVERSIDES, F.G.; BLACKBURN, H.D. Avaliação de técnicas de remoção de glicerol, crioprotetores e métodos de inseminação para

criopreservar espermatozoides de galo com implicações de regeneração de raça ou linha ou ambos. **Poultry Science**, v. 88, p. 2184 – 2191, 2009.

QADEER, S.; KHAN, M.A.; ANSARI, M.S.; RAKHA, B.A.; EJAZ, R.; HUSSNA, A.; ASHIQ, M.; IQBAL, R.; ULLAH, N.; AKHTER, S. Evaluation of antifreeze protein III for cryopreservation of Nili-Ravi (*Bubalus bubalis*) buffalo bull sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 148, p. 26-31, 2014.

ROTH, T.L.; WEISS, R.B.; BUFF, L.M.; BUSH, L.M.; WILDT, D.E.; BUSH, M. Heterologous in vitro fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 475–482, 1998.

SANTIAGO-MORENO, C.; CASTAÑO, A.; TOLEDANO-DIAZ, M.; COLOMA, A.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, M.; PIETRO, J. Criopreservação de sêmen para a criação de um criobanco de raças avícolas espanholas: otimização da taxa de congelamento e tempo de equilíbrio. **Poultry Science**, v. 90, p. 2047 – 2053, 2011.

SHALIUTINA-KOLESOVA, A.; DIETRICH, M.; XIAN, M.; NIAN, R. Efeitos da transferrina do plasma seminal nos espermatozoides criopreservados da carpa *Cyprinus carpio* e comparação com albumina sérica bovina e proteínas anticongelantes. **Animal Reproduction Science**, v. 204, p. 125–130, 2019.

SILVA, E.C.B.; GUERRA, M.M.P. Sondas fluorescentes: um avanço na avaliação da integridade estrutural e funcional de espermatozoides. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 11, n. 2, p. 162-169, 2014.

RUBINSKY, B.; DEVRIES, A. L. Effects of ice crystal habit on the viability of glycerol protected red blood cells. **Cryobiology**, v. 26, p. 580, 1989.

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

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

ZANDIYEH, S; SHAHVERDI, A.; EBRAHIMI, B.; SABBAGHIAN, M. A novel approach for human sperm cryopreservation with AFP III. **Reproduction Biology**, v. 20, p. 169-174, 2020.

ZILLI, L.; BEIRÃO, J.; SCHIAVONE, R.; HERRAEZ, M.P.; GNONI, A.; VILELLA, S. Comparative Proteome Analysis of Cryopreserved Flagella and Head Plasma Membrane Proteins from Sea Bream Spermatozoa: Effect of Antifreeze Proteins. **PlosOne**, v. 9, p. 6, 2014.

## 6 Considerações finais

O aprimoramento dos protocolos de criopreservação de sêmen caprino é importante para o crescimento da caprinocultura no país. No entanto, algumas condições durante a criopreservação podem ser causas fundamentais da baixa qualidade do sêmen pós-descongelamento, uma delas é a formação de cristais de gelo. É por isso que essas proteínas foram utilizadas em diluidores de sêmen, com o intuito de minimizar os danos causados na congelação-descongelamento dos espermatozoides.

Os resultados do primeiro artigo permitem considerações iniciais sobre os efeitos da suplementação do diluidor de congelação de espermatozoide caprino com PAC III, antes do processo de criopreservação. A adição da PAC III ao diluidor Tris-gema de ovo, usado para a congelação de espermatozoides obtidos do epidídimo de caprinos, não apresenta efeito sobre a cinética espermática, potencial de membrana mitocondrial e produção intracelular de ROS. O uso de 100 µg/mL dessa proteína diminui o percentual de espermatozoides portadores de membrana plasmática e acrossomal intactas. A ausência de efeitos significativos ou negativos do tratamento com PAC III, para as concentrações testadas no presente estudo, pode ter ocorrido pela suplementação com níveis insuficientes ou excessivos.

Mesmo quando utilizado dois tipos de diluidores para congelação de sêmen caprino, concentrações (1, 10 e 100 µg/mL) de PAC III em ambos diluidores (LD e TGO) foram incapazes de exibir seus efeitos crioprotetores nos espermatozoides de bode. Além disso, adição da PAC III causou danos erosivos na membrana plasmática localizada na cabeça dos espermatozoides e danos localizados na região do colo.

Mais estudos serão necessários para se obter resultados mais concretos a respeito das concentrações mais eficazes que possam melhorar a qualidade do sêmen caprino pós- descongelamento, pois a confirmação e esclarecimento dos resultados relatados exigem uma investigação mais aprofundada.