



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE
HUMANA E ANIMAL
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE HUMANA E
ANIMAL

WCLEUDEM MATIAS NASCIMENTO

BIOPROSPECÇÃO DA BROMELINA NA QUALIDADE DO SÊMEN CAPRINO

TERESINA - PIAUÍ

2021

WCLEUDEM MATIAS NASCIMENTO

BIOPROSPECÇÃO DA BROMELINA NA QUALIDADE DO SÊMEN CAPRINO

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para à obtenção do título de mestre em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal. Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rômulo José Vieira.

Coorientador: Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula.

TERESINA – PIAUÍ

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Nascimento, Wcleudem Matias.

Bioprospecção da bromelina na qualidade do sêmen caprino [recurso eletrônico] / Wcleudem Matias Nascimento. - 2021.

73 f. : il.

Dissertação (MESTRADO PROFISSIONAL) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Curso de Programa de Pós-graduação Em Biotecnologia Em Saúde Humana E Animal Nível Mestrado, Fortaleza, 2021.

Orientação: Prof. Dr. Rômulo José Vieira..

1. Caprino. Extrato de bromelina.
Criopreservação. Sêmen.. I. Título.

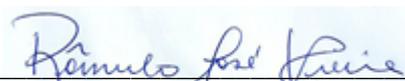
WCLEUDEM MATIAS NASCIMENTO

BIOPROSPECÇÃO DA BROMELINA NA QUALIDADE DO SÊMEN CAPRINO

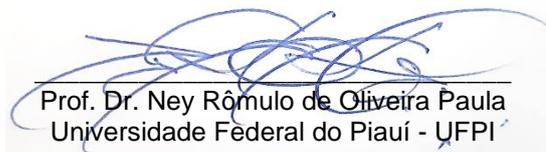
Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para à obtenção do título de mestre em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal. Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em: 23 de novembro de 2021.

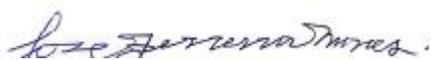
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Rômulo José Vieira (Orientador)
Universidade Estadual do Piauí - UESPI



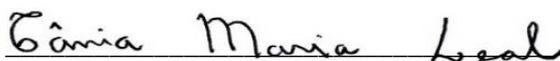
Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula
Universidade Federal do Piauí - UFPI



Prof. Dr. José Ferreira Nunes
Universidade Estadual do Ceará – UECE



Profa. Dra. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro
Universidade Estadual do Ceará – UECE



Dra. Tania Maria Leal
EMBRAPA Meio-Norte



Profa. Dra. Janaina de Fátima Saraiva Cardoso
Universidade Federal do Piauí - UFPI

Dedico primeiramente a Deus, e às pessoas mais importantes da minha vida, sem as quais não teria realizado esse sonho, são elas: meu saudoso pai (Josimar Pereira do Nascimento) e minha amada mãe Nágila Maria Matias Nascimento; minha esposa Lívia Moura Santos; minha filha Lícia Moura Santos Matias Nascimento; minhas irmãs Wcleubianne Matias e Wcleudianne Matias; minhas avós Josefa Ferreira e Maria Zélia; meu orientador Dr. Rômulo José Vieira; e meu coorientador Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua abundante graça e bençãos derramadas em minha vida.

Aos meus pais, que sempre lutaram incansavelmente pela minha educação e realização dos meus sonhos.

A minha irmã Wcleubianne Matias, por me proporcionar a logística durante o mestrado.

A minha esposa Lívia Moura, companheira, atenciosa, cuidadosa e por gerar o fruto do nosso amor, nossa princesa Lícia Moura Matias, responsável por nossa alegria diária, e minha motivação de viver;

Ao Prof. Dr. Rômulo José Vieira, pela orientação, paciência, apoio, confiança, ensinamentos. Ao Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula, pela coorientação, confiança, ensinamentos e contribuição com a realização do experimento.

À Prof.^a Dr.^a Janaína de Fátima Saraiva Cardoso, pela colaboração nas análises estatísticas e banca de dissertação.

À Prof.^a Dr.^a Cristiane Clemente de Mello Salgueiro, por participar da banca examinadora do meu trabalho e pela colaboração do mesmo.

Ao Prof. Dr. José Ferreira Nunes, pelas contribuições desse trabalho e por tanta experiência compartilhada e fazer parte da banca de dissertação.

Ao Prof. Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho pelo apoio em Biotecnologia. Ao Prof. Dr. Fabrício Pires de Moura do Amaral e sua orientanda Larissa Roque, pela atenção no teste COMETA no Laboratório de Mutagenicidade (LABMUT) do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia e Biodiversidade (NPBio/ UESPI).

À Pesquisadora Dra. Tania Maria Leal EMBRAPA Meio-Norte, por fazer parte da banca de dissertação.

Ao grupo de Pesquisa em Sanidade e Reprodução Animal da UFPI, pela contribuição e realização desse trabalho.

A empresa ACP Biotecnologia, pela doação do diluente ACP-101c[®].

A todos Professores que fazem parte do programa de Mestrado Profissional em Biotecnologia da Saúde Humana e Animal da UESPI/UECE.

Aos proprietários e funcionários da fazenda Santo Antônio na cidade de Campo Maior – Pi, pela doação dos animais para realização do experimento.

RESUMO

A caprinocultura tem um importante papel sócio econômico na região Nordeste do Brasil, haja vista quase a totalidade do rebanho caprino está situado nessa região. Essa atividade contribui com a geração de renda e fonte de proteína acessível para a agricultura de subsistência. Diante da relevância dessa atividade, objetivou-se avaliar o efeito da bromelina sobre a qualidade espermática, pós-descongelação, em caprinos. Para tanto foram utilizados cinco caprinos da raça Anglo Nubiana, em idade reprodutiva e clinicamente saudáveis. A colheita do sêmen foi realizada com o auxílio de uma vagina artificial específica para pequenos ruminantes, pré-aquecida a uma temperatura de 39°C, acoplada a um tubo coletor graduado. Após colheita o sêmen foi depositado em banho-maria à temperatura de 37°C. Imediatamente procedeu-se as análises espermáticas. Seguidamente a análise da concentração espermática, o volume total do *pool* foi dividido em cinco grupos. Um pertencente ao grupo controle, que foi composto de (ACP-101/102[®]) e os outros quatro os grupos tratamentos com ACP-101/102[®] acrescidos com bromelina nas concentrações de 5%; 10%; 15% e 20%. As amostras foram criopreservadas com auxílio do aparelho Tk3000[®] (TK Tecnologia em Congelação LTDA, Uberaba, Brasil), seguindo-se as instruções do fabricante. Posteriormente, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido (-196°C) e armazenadas em botijões criogênicos. Após o período mínimo de uma semana as amostras foram descongeladas e avaliadas por meio do sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis). Posteriormente foram realizados testes de termo resistência, sondas fluorescente para avaliação da integridade de membrana e acrossomo, teste cometa para avaliação da integridade do DNA espermático e teste de análise ultraestrutural dos espermatozoides por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Após a descongelação, a motilidade espermática total avaliada pelo sistema CASA foi mais bem preservada no grupo controle e no grupo experimental, utilizando a concentração de 5% em comparação ao uso da maior concentração (20%). A velocidade curvilínea (VCL) e velocidade média da trajetória (VAP) dos espermatozoides foram maiores no grupo controle em comparação aos demais. Entre os grupos utilizando bromelina, menores velocidades foram verificadas nos espermatozoides do grupo utilizando 20% desde componente. Em relação a integridade do DNA as respectivas concentrações de bromelina (5%; 10%; 15% e

20%) não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle, dessa forma fica visível que a bromelina não apresenta genotoxicidade aos espermatozoides caprinos. A análise ultraestrutural revelou que o grupo contendo 5% de Bromelina demonstrou preservação intermediária apresentando células bem preservadas a nível de peça intermediária e cauda e no grupo contendo 10% foi observado baixa preservação celular, demonstrando que a bromelina nessa concentração pode levar efeitos nocivos aos espermatozoides. Portanto, o uso da Bromelina adicionada ao diluidor/crioprotetor de sêmen caprino mostrou-se satisfatório nos parâmetros seminais pós descongelação. No entanto, mais estudos são necessários a fim de aperfeiçoar e validar o uso da bromelina em tecnologias reprodutivas como a criopreservação seminal.

Palavras-chave: Caprino. Extrato de bromelina. Criopreservação. Sêmen.

ABSTRACT

Goat farming has an important socio-economic role in the Northeast region of Brazil, as almost all of the goat herd is located in this region. This activity contributes to income generation and a source of affordable protein for subsistence agriculture. Given the relevance of this activity, the objective was to evaluate the effect of bromelain on sperm quality, post-thawing, in goats. For this purpose, five Anglo Nubian goats of reproductive age and clinically healthy were used. Semen collection was performed with the aid of an artificial vagina specific for small ruminants, pre-heated to a temperature of 39°C, coupled to a graduated collection tube. After collection, the semen was placed in a water bath at a temperature of 37°C. Immediately, sperm analysis was performed. Following the analysis of sperm concentration, the total pool volume was divided into five groups. One belonging to the control group, which was composed of (ACP-101/102®) and the other four groups, treatments with ACP-101/102® added with bromelain at 5% concentrations; 10%; 15% and 20%. The samples were cryopreserved using the Tk3000® device (TK Tecnologia em Congelação LTDA, Uberaba, Brazil), following the manufacturer's instructions. Later, the straws were immersed in liquid nitrogen (-196°C) and stored in cryogenic cylinders. After a minimum period of one week, the samples were thawed and evaluated using the CASA system (Computer Assisted Sperm Analysis). Subsequently, thermoresistance tests, fluorescent probes to assess membrane and acrosome integrity, comet test to assess sperm DNA integrity and ultrastructural analysis of sperm using transmission electron microscopy were performed. After thawing, total sperm motility assessed by the CASA system was better preserved in the control group and in the experimental group using the 5% concentration compared to using the highest concentration (20%). The curvilinear velocity and mean trajectory velocity of sperm were higher in the control group compared to the others. Among the groups using bromelain, lower velocities were verified in the sperm of the group using 20% of this component. Regarding DNA integrity, the respective concentrations of bromelain (5%, 10%, 15% and 20%) did not show significant difference compared to the control group, thus it is visible that bromelain does not present genotoxicity to goat sperm. The ultrastructural analysis revealed that the group containing 5% of Bromelain showed intermediate preservation, presenting well-preserved cells at the level of the intermediate piece and tail, and in the group containing 10%, low cell preservation was

observed, demonstrating that bromelain in this concentration can have harmful effects on sperm. Therefore, the use of Bromelain added to the goat semen extender/cryoprotector proved to be satisfactory in the seminal parameters after thawing. However, more studies are needed in order to improve and validate the use of bromelain in reproductive technologies such as seminal cryopreservation.

Keywords: Goat. Bromelain extract. Cryopreservation. Semen.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Comprimento da cauda do cometa, referente à fragmentação do DNA de espermatozoides oriundos do sêmen caprino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) acrescido ou não de extrato de bromelina pós-descongelamento..... 40**
- Figura 2 – Percentual de fragmentação do DNA de espermatozoides oriundos do sêmen caprino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) acrescido ou não de extrato de bromelina pós-descongelamento..... 40**
- Figura 3 – Análise ultraestrutural de espermatozoide criopreservado em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) sem adição de bromelina (grupo controle) através de microscopia eletrônica de transmissão..... 41**
- Figura 4 – Análise ultraestrutural de espermatozoide criopreservado em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) com adição de extrato de bromelina 5% através de microscopia eletrônica de transmissão..... 42**
- Figura 5 – Análise ultraestrutural de espermatozoide criopreservado em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) com adição de extrato de bromelina 10% através de microscopia eletrônica de transmissão..... 43**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Descrição do grupo controle e grupos experimentais....	30
Tabela 2 –	Média e desvio padrão da motilidade e vigor espermático do sêmen caprino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) acrescido ou não de extrato de bromelina e avaliado após cinco minutos de incubação em banho Maria a 37 °C.....	36
Tabela 3a –	Média e desvio padrão da cinética espermática do sêmen caprino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) acrescido ou não de extrato de bromelina pós-descongelção.....	37
Tabela 3b –	Média e desvio padrão da cinética espermática do sêmen caprino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) acrescido ou não de extrato de bromelina após descongelção.....	37
Tabela 4 –	Média e desvio padrão dos percentuais de membrana plasmática e acrossomal íntegra e mitocôndria com potencial, de sêmen caprino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) acrescido ou não de extrato de bromelina pós-descongelção.....	38
Tabela 5 –	Média e desvio padrão dos percentuais da morfologia espermática do sêmen caprino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) acrescido ou não de extrato de bromelina pós-descongelção.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP®	Água de Coco em Pó
ALH	Amplitude Lateral da Cabeça
ANOVA	Análise de Variância
BCF	Batimento Flagelar Cruzado
CASA	<i>Computer Assisted Sperm Analyses</i>
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DFDA	Diacetato de Carboxifluoresceína
g	Gramas
IP	Iodeto de Propídeo
LIN	Linearidade
LTDA	Limitada
LTSCO	Laboratório de Biotecnologia do Sêmen Caprino e Ovino
ML	Mililitros
MP	Motilidade Progressiva
MT	Motilidade Total
NIB	Núcleo Integrado de Biotecnologia
pH	Potencial Hidrogeniônico
ROS	Espécies Reativas ao Oxigênio
STR	Retilinearidade
TRIS	Tris hidroximetil aminometano
UESPI	Universidade Estadual do Piauí
VAP	Velocidade Média do Percurso
VCL	Velocidade Curvilínea
VSL	Velocidade em Linha Reta
WOB	Índice de Oscilação
µl	Microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	Caprinocultura.....	17
2.2	Exame andrológico em caprinos.....	18
2.3	Diluidores utilizados na criopreservação seminal.....	19
2.4	Bromelina.....	20
2.5	Água de coco em pó (ACP).....	20
2.6	Criopreservação de sêmen.....	21
2.7	Principais crioinjúrias às células espermáticas.....	22
2.8	Análises seminais.....	23
2.8.1	Análise espermática auxiliada por computador – CASA.....	23
2.8.2	Análise espermática por sondas fluorescentes.....	24
2.8.3	Análise espermática pelo teste cometa.....	25
2.8.4	Análise ultraestrutural de células espermáticas por microscopia de eletrônica.....	26
3	OBJETIVOS.....	27
3.1	Geral.....	27
3.2	Específicos.....	27
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1	Ética em experimentação animal.....	28
4.2	Local de realização do estudo.....	28
4.3	Animais e desenho experimental.....	29
4.4	Colheita e avaliação do sêmen fresco.....	30
4.5	Diluição, processamento e criopreservação seminal.....	31
4.6	Análise espermática auxiliada por computador (CASA) pós-descongelamento.....	32
4.7	Análise morfológica das células espermáticas.....	33
4.8	Análise da integridade de membrana plasmática, acrossomal e atividade mitocondrial pós-descongelamento.....	33
4.9	Análise da integridade do DNA espermático pelo teste Cometa...	34
4.10	Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão.....	34

4.11	Análises estatísticas.....	34
5	RESULTADOS.....	36
6	DISCUSSÃO.....	44
7	CONCLUSÃO.....	48
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49
9	PERSPECTIVAS.....	50
	REFERÊNCIAS.....	51
	ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	57
	ANEXO B – CARTA DE SUBMISSÃO.....	58
	ANEXO C – ARTIGO DE ACORDO COM AS NORMAS DO PERIÓDICO RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT.....	59

1 INTRODUÇÃO

O rebanho nacional de caprinos, no ano de 2020, alcançou 11,3 milhões de cabeças, sendo 10,7 milhões de cabeças oriundas da Região Nordeste do Brasil. Dessa forma, apresentando uma participação nacional de 94,6% (IBGE, 2020). Esses dados demonstram a importância socioeconômica da caprinocultura nessa região, como, por exemplo, na geração de renda e fonte proteica de baixo custo para as famílias que praticam a agricultura de subsistência (SILVA, 2016).

As biotécnicas aplicadas à reprodução animal como a inseminação artificial, transferência de embriões, produção *in vitro* de embriões, indução e sincronização de estro e criopreservação de gametas, têm sido cada vez mais requeridas e aplicadas na prática zootécnica quanto ao manejo reprodutivo da espécie caprina. No entanto, algumas biotécnicas ainda não alcançaram o seu total aperfeiçoamento técnico dentro da reprodução caprina, como a criopreservação de sêmen. Os grandes entraves encontrados referem-se ao menor potencial fecundante do sêmen após a descongelação, maiores custos com materiais, inseminação no momento mais próximo da ovulação e técnicas utilizadas durante inseminação artificial (MILLER, 2008).

É nesse contexto que ressalta-se a importância do desenvolvimento de biotécnicas mais bem elaboradas e adequadas para preservação e armazenamento do sêmen caprino, uma vez que possibilitará o melhor aproveitamento de animais com alto valor zootécnico, diminuindo os gastos e riscos com transporte de animais e permitindo a conservação de material genético por tempo indeterminado (NASCIMENTO *et al.*, 2015).

As células espermáticas possuem a capacidade inerente de produzir espécies reativas ao oxigênio (EROS), as quais são responsáveis por alterações espermáticas indispensáveis ao processo de fertilização. No entanto, a produção excessiva de EROS determina o estresse oxidativo que prejudica a sobrevivência e a manutenção da capacidade fertilizante desses gametas. E alguns procedimentos realizados em laboratório para a congelação de sêmen, podem aumentar a produção de EROS (SILVA *et al.*, 2008).

Nesse sentido, há um número crescente de estudos focados na criopreservação de sêmen dos animais domésticos, a fim de desenvolver meios diluentes acrescidos de substâncias capazes de manter a motilidade espermática e o

poder fecundante dessas células, bem como, a redução dos danos oxidativos gerados pelas espécies reativas de oxigênio (EROS) (TONIOLLI et al., 2014). E dentre as substâncias acrescentadas aos meios diluentes destacam-se a água de coco em pó (ACP), leite desnatado, TRIS gema, cálcio e entre outros (SALGUEIRO; NUNES, 2012).

Além disso, ainda existe muito a ser explorado nas pesquisas, sobretudo, visando a elaboração de meios diluentes a base de substratos de origem vegetal, como, por exemplo, o extrato de bromelina, que segundo MIRANDA (2014) é um complexo enzimático constituído, principalmente, por proteases e obtido a partir dos tecidos vegetais de abacaxizeiro, bem como de outros representantes da família Bromeliácea. Tem seu aproveitamento ligado a inúmeras aplicações, especialmente terapêuticas, que são atribuídas tanto à sua atividade proteolítica, como a de outros componentes do extrato.

Sua gama de aplicações abrange a indústria de alimentos, no amaciamento de carne, clarificação de bebidas, produção de hidrolisados de proteína, indústria têxtil, couro, cosméticos e, especialmente, a indústria farmacêutica, tendo inúmeras atividades terapêuticas relatadas (BALA *et al.*, 2012).

Suas ações biológicas descritas são: fibrinolítica, anti-inflamatória, antioxidante, anticoagulante, imunomoduladora, desbridante de ferimentos e queimaduras, antiedematosa, antineoplásica, bem como aumento da absorção de antibióticos, dentre outros (MOURA, 2010).

Visando reduzir a depleção das células espermáticas durante o processo de congelação/descongelação, objetivou-se, por meio desta pesquisa, avaliar o efeito de um substrato de origem vegetal ainda não utilizado em pesquisas, o extrato de bromelina, sobre a qualidade espermática do sêmen caprino pós descongelação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caprinocultura

O Brasil possui um número expressivo de caprinos com aproximadamente 10,7 milhões de animais, onde a Região Nordeste vem se destacando a cada dia na criação de caprinos, representando 93,9% deste total. Neste contexto, os estados da Bahia, Pernambuco e Piauí se destacam por liderarem o *ranking* apresentando 79,6%, do efetivo nacional (IBGE, 2019).

A caprinocultura e ovinocultura são atividades produtivas realizadas em grande parte do Brasil, destacando as regiões Sul e Nordeste, locais onde se concentram o maior número desses animais. Vale ressaltar que a caprinocultura está aumentando na demanda nacional e mundial e tem ganhado destaque no agronegócio brasileiro (FAO, 2016). Esse desenvolvimento se dá devido ao aumento da apreciação dos produtos oriundos da cultura e, para regiões de clima semiárido, por esses animais serem considerados mais rústicos e possuírem uma maior adaptação ao clima (SOUSA *et al.*, 2017).

Além disso, a caprinocultura tem sido uma atividade bastante difundida, pois o mercado dos produtos oriundos da criação de caprinos é crescente em todo país, (SILVA; FAVARIN, 2020). Outro fator que influencia o desenvolvimento da caprinocultura no Nordeste é o clima predominante na região, possibilitando a presença de vegetais arbustivos, de galhos retorcidos e raízes profundas, adaptados à capacidade de retenção da água disponível e à perda das pequenas folhas, fazendo com que as plantas conservem energia e evitem a perda da água por evapotranspiração (SAMPAIO, 2010).

Dessa forma, com o crescimento apresentado pelo setor da caprinocultura, a implementação de biotecnologias da reprodução vem crescendo nos últimos anos, a fim de obter melhoramento genético do rebanho nacional, além de melhorar e otimizar a eficiência reprodutiva desses animais (PEREIRA *et al.*, 2017).

2.2 Exame Andrológico em caprinos

O exame andrológico se baseia na avaliação da saúde geral, saúde genética, e saúde do sistema genital, ou seja, na avaliação da *potentia coeundi* e *potência generandi* (CBRA, 2013). A avaliação andrológica, inicia-se com a identificação do paciente e proprietário, passando para anamnese, exame físico, avaliação do comportamento sexual, espermograma, exames complementares, e finalizando com diagnóstico e emissão do laudo (CBRA, 2013).

Durante a avaliação de um reprodutor, é necessário e indispensável fazer a anamnese ou história clínica do animal, ou seja, analisar o regime de atividade sexual do animal: monta natural ou doador de sêmen; frequência de ejaculação; número de coberturas; índice de retorno ao cio; condições de manejo e alimentação; situação sanitária e reprodutiva do rebanho (SALMAZZO; FRRARI, 2019).

Para a avaliação dos órgãos do sistema genital, utiliza-se observação, inspeção e palpação, podendo ser complementada com auxílio da ultrassonografia. Devem-se analisar, nesta fase do exame, presença e posição dos órgãos, bem como dimensão, consistência, simetria e mobilidade (RIBEIRO, 2018).

O Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), determinou um roteiro base: a identificação detalhada do animal, do proprietário e da propriedade; exame clínico do animal composto de anamnese, exame geral e do sistema genital (interno e externo), comportamento (libido); espermograma (método de colheita, características físicas e morfológicas do sêmen), diagnóstico e/ou conclusão.

A avaliação andrológica é uma etapa essencial no processo de criopreservação do sêmen, visto que a amostra seminal precisa ser avaliada previamente a congelação. É essencial que a utilização de excelentes amostras de sêmen, uma vez que a congelação pode gerar crioinjúrias às células espermáticas (SANTOS *et al.*, 2016). Vale ressaltar que todo reprodutor submetido a uma avaliação andrológica, com vistas ao seu aproveitamento, deve ser classificado em apto, questionável ou inapto (CBRA, 2013).

2.3 Diluidores utilizados na criopreservação seminal

Na tecnologia de conservação de gametas a elaboração e uso de diluidores é fundamental para o sucesso da criopreservação. Os diluidores têm por finalidade nutrir e proteger os espermatozoides contra os efeitos da baixa temperatura de conservação (PINTO, 2015). Nas últimas duas décadas, vários protocolos e diluidores para criopreservação foram desenvolvidos pela incorporação de diferentes crioprotetores e constituintes, mostrando bons resultados (GIL *et al.*, 2013; SEIFI-JAMADI *et al.*, 2016).

Os diluidores/crioprotetores utilizados na congelação de sêmen das mais variadas espécies têm a função de evitar a formação de cristais de gelo no espaço intracelular, reduzir o estresse osmótico por meio da reposição de água necessária para manutenção do volume celular, interagir com íons e macromoléculas, reduzir o ponto de congelação da água, assim como servir de tampão para ajustes de possíveis alterações do potencial de hidrogênio - pH (ASMA UL HUSNA *et al.*, 2017).

Na atualidade os diluidores oferecem boa proteção à integridade espermática, entretanto, é possível inferir que a baixa fertilidade do sêmen congelado de caprinos está relacionada, fundamentalmente com a composição dos diluidores, que pode favorecer modificações na distribuição e características dos componentes de membrana que cobrem os espermatozoides, resultando na sua desestabilização. Esta desestabilização está correlacionada ao aumento de fluidez da bicamada lipídica da membrana o que a torna mais permeável, favorecendo a entrada de cálcio livre no interior da célula, o qual por sua vez estimula o processo de capacitação (SILVA, 2007).

Dessa forma, nos últimos anos, tem-se observado um amplo desenvolvimento de substâncias adicionadas ao diluente no processo de criopreservação de sêmen em animais domésticos (SOUSA *et al.*, 2014). Nesse contexto, diluidores alternativos a base de substratos de origem vegetal possibilitam um maior controle sanitário do produto, especialmente quando se pretende introduzir o material biológico em diferentes rebanhos dentro do País ou exportá-lo (BITTENCOURT *et al.*, 2013).

2.4 Bromelina

Bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nas plantas da família da *Bromeliaceae*, da qual o abacaxi (*Ananas comosus var. comosus*) é o mais conhecido (NADIZARAH *et al.*, 2013; TAP *et al.*, 2016).

O fruto do abacaxi é normalmente utilizado como alimento, os caules são considerados resíduos sendo, assim, uma boa fonte de obtenção de bromelina. Além disso, diferentes partes da planta podem ser usadas como matéria-prima para a obtenção da bromelina, tais como: folhas, talos, polpa da fruta, cascas e resíduos industriais do processamento do fruto (NADIZARAH, 2013; RAMLI *et al.*, 2017). A bromelina comercial é um produto de alto valor agregado. Isso se deve ao alto custo dos processos atualmente disponíveis para sua purificação e obtenção, de modo que estudos já foram realizados a fim de desenvolver novas metodologias de purificação de bromelina a partir de resíduos de abacaxizeiro (BALA *et al.*, 2012; COSTA, 2014).

Seu destaque vai além de sua ampla aplicação e interesse industrial, pois pode ser obtida a partir de resíduos agrícolas e agroindustriais do abacaxizeiro o que reforça a mentalidade sustentável (BERTEVELLO, 2001; MAURER, 2001; MYNOTT, 1997; NADIZARAH *et al.*, 2013).

A enzima é composta por muitos aminoácidos. Além disso, é uma glicoproteína que tem um oligossacarídeo por molécula, o qual encontra-se covalentemente ligado a uma cadeia polipeptídica. Apresenta como principal resíduo aminoterminal a valina, e como resíduo carboxiterminal a glicina (COSTA, 2014).

Nesse sentido, a adição de substâncias aos crioprotetores, como, por exemplo, aminoácidos, ao meio de congelamento, pode melhorar não somente a qualidade seminal pós descongelamento, mas também a capacidade fertilizante desses espermatozoides (NOGUEIRA, 2017).

2.5 Água de coco em pó (ACP)

A composição básica da água de coco é de 93% de água, 4% de carboidratos, 0,1% de gorduras, 0,02% de cálcio, 0,01% de fósforo, 0,5% de ferro, além de aminoácidos, vitamina C e vitaminas do complexo B (ARAGÃO, 2000). Os

cátions predominantes são potássio, cálcio e magnésio. Sódio, cloro e fosfato são encontrados em menores concentrações (LIMA *et al.*, 2015).

Em consequência das variações físico-química da água de coco *in natura* e disponibilidade de frutos em estágios ideias, elaborou-se um meio de conservação à base de água de coco em pó (ACP[®], ACP Biotecnologia, Fortaleza, Ceará, Brasil), caracterizado pela padronização e estabilização da água de coco por meio de um processo de desidratação e subsequente formulação de meios de conservação específicos para células e tecidos (SALGUEIRO *et al.*, 2002), privilegiando e mantendo os mesmos constituintes bioquímicos da água de coco *in natura*, tendo ainda a vantagem de ser facilmente estocado, transportado e preparado (VIVEIROS *et al.*, 2010). Dessa forma, uma vez processada, não modifica sua composição até sua utilização, garantindo um padrão confiável (PINTO *et al.*, 2015).

Devido a suas características que a classificam como um bom diluente de sêmen, a água de coco teve efeito benéfico em estudos realizados em várias espécies como: suína (AIRES; TONIOLLI, 2005), bovina (ALBERTI, 2004), bubalina (ZORZETTO *et al.*, 2017), caprina (AZEVEDO; TONIOLLI, 1999; NUNES; SALGUEIRO, 1999), ovina (BRAZ *et al.*, 2003), felina (SILVA *et al.*, 2007), canina (CARDOSO *et al.*, 2005), primata (ARAÚJO *et al.*, 2007) e humanos (NUNES, 1998).

2.6 Criopreservação de sêmen

A criopreservação de sêmen é uma técnica valiosa para produção de caprinos, já que permite coletar e armazenar sêmen fora da época de reprodução, para uso posterior, aumentando o número de fêmeas que poderão ser inseminadas com o sêmen de um determinado reprodutor. Além disso, o sêmen criopreservado pode ser transportado para áreas distantes e pode ser utilizado para formação de bancos de germoplasma, principalmente quando trata-se de um reprodutor de alto mérito zootécnico, mas que apresenta limitações físicas, as quais o impede de realizar a monta natural, ou até mesmo que já morreu. Dessa forma, o sêmen criopreservado pode economicamente impactar na produção pecuária comercial de várias espécies (KONYALI *et al.*, 2013).

A resposta dos espermatozoides à criopreservação varia entre machos da mesma espécie, bem como em diferentes espécies. Em geral, os espermatozoides de pequenos ruminantes são extremamente sensíveis à criopreservação quando

comparado a outras espécies de animais domésticos. Sendo a criopreservação de sêmen de caprinos ainda é muito desafiadora (PURDY, 2006).

A criopreservação de sêmen proporciona uma série de vantagens, dentre elas é possível citar o armazenamento do material genético por tempo indeterminado, redução de custos com aquisição e transporte de reprodutores e a diminuição da propagação de doenças sexualmente transmissíveis entre rebanhos. No entanto, o processo de congelação e descongelação resulta na perda de considerável número de espermatozoides, o que pode comprometer o objetivo final, que é a fecundação do oócito (LEITE *et al.*, 2011).

A criopreservação auxilia na manutenção da viabilidade seminal para que o sêmen possa ser armazenado pelo tempo necessário (GARCIA *et al.*, 2010), pode auxiliar na diminuição do transporte de machos para um programa de melhoramento genético, além de garantir o intercâmbio internacional de material genético (KAEOKET *et al.*, 2012).

Os principais fatores que podem influenciar na sobrevivência espermática após a criopreservação são: propriedades osmóticas dos gametas, taxas de resfriamento e aquecimento e formação de cristais de gelo intracelular (STĂNESCU; BÎRȚOIU, 2012). No entanto, outro fator de grande importância é o diluidor e seus componentes que poderá auxiliar na redução de cristais de gelo (SANTOS *et al.*, 2016).

2.7 Principais crioinjúrias às células espermáticas

A criopreservação de espermatozoides é um processo complexo, uma vez que inclui muitos estágios e fatores críticos que podem afetar os parâmetros pós-descongelação (TULI *et al.*, 1991). Processos de criopreservação e descongelamento induzem ao estresse oxidativo na membrana espermática, causando danos irreversíveis ao espermatozoide, e mudanças na sua fluidez, estrutura e atividade enzimática (NAJAFI *et al.*, 2014).

As células espermáticas normalmente sofrem lesões durante a criopreservação devido às ocorrências das micelas invertidas na membrana plasmática e intensificação do estresse oxidativo celular, afetando negativamente o metabolismo energético, motilidade e mobilidade, morfologia e integridade do DNA dos espermatozoides (SILVA, 2013). Os danos causados aos espermatozoides pela

criopreservação são irreversíveis e conseqüentemente reduzem a fertilidade da célula quando comparado ao sêmen *in natura* ou refrigerado (MORAES *et al.*, 2015).

Um cuidado considerável deve ser exercido durante a criopreservação do sêmen, para evitar lesionar o espermatozoide durante esse processo (JAFAROGHLI *et al.*, 2011). A membrana plasmática do espermatozoide é fortemente afetada por vários processos bioquímicos e danos anatômicos no procedimento de criopreservação (EMAMVERDI *et al.*, 2013). Durante o resfriamento, os fosfolipídios ligados à membrana se reorientam o que pode levar à ruptura da membrana espermática e à deterioração de suas funções (AMANN; GRAHAM, 1993; LESSARD *et al.*, 2000).

O estudo sobre as modificações ocorridas no espermatozoide e em suas membranas durante a redução da temperatura elucida possíveis lesões e diminuição da capacidade fertilizante deste gameta masculino e possibilita a elaboração de estratégias para reduzir tais injúrias, como a seleção e/ou associação de crioprotetores mais eficazes para determinada espécie, assim como a adição de componentes que podem oferecer substratos ou remover os causadores de lesões celulares, como as espécies reativas ao oxigênio (SILVA; GUERRA, 2011).

2.8 Análises seminais

Após o processo de congelação/descongelação, as análises seminais são indispensáveis para a confirmação da viabilidade das células espermáticas após esses procedimentos. Essas análises podem ser realizadas em laboratório – *in vitro* ou *in vivo*, a partir da realização de inseminações artificiais, visam estimar o potencial de fertilidade do macho, através de avaliações que atestem a funcionalidade, integridade e viabilidade espermática (KUÇUK *et al.*, 2014).

2.8.1 Análise espermática auxiliada por computador – CASA

Até recentemente, a avaliação do sêmen caprino era rotineiramente realizada por meio de técnicas de microscopia de luz convencional. No entanto, as limitações destes métodos incluem subjetividade, variabilidade e pobre correlação com o potencial fertilizante. Nos últimos anos, novas técnicas de avaliação *in vitro* têm

sido utilizadas para avaliação do sêmen caprino, permitindo o conhecimento mais detalhado de várias características espermáticas (BATISTA; GUERRA, 2010).

O CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) é um sistema automático (hardware e software) utilizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas, fornecendo informações acuradas, precisas e significativas do movimento individual de cada célula bem como de subpopulações de células espermáticas (AMANN; KATZ, 2004). Para reduzir a subjetividade, sistemas automáticos para análise computadorizada de sêmen (CASA) vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de fornecer dados acurados da motilidade de cada espermatozoide e resumo estatístico das subpopulações (VERSTEGEN *et al.*, 2002)

A criação do sistema CASA possibilitou adquirir informações concisas sobre as características cinéticas das células espermáticas do ejaculado (AMANN; WABERSKI, 2014). A avaliação da cinética espermática realizada através do CASA tem permitido maior objetividade e precisão nas avaliações, desta forma é caracterizada como importante análise na determinação da qualidade seminal, realizando avaliações múltiplas e repetidas, e seus efeitos estão relacionados a fertilidade espermática (GUARDIEIRO, 2013). Estes sistemas oferecem informações sobre a cinética espermática, com a utilização de campos de vídeo contendo imagens de espermatozoides eletronicamente digitalizados, bem como a determinação da posição central de cada cabeça espermática. Os parâmetros fornecidos por este equipamento são: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR) e índice de oscilação ou wobble (WOB), expressos em percentual; velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL) e velocidade média do percurso (VAP), expressos em $\mu\text{m/s}$; frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), expresso em Hertz e amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide (ALH), expresso em micrômetros (MORTIMER, 2000; VERSTEGEN *et al.*, 2002).

2.8.2 Análise espermática por sondas fluorescentes

Sondas fluorescentes que apresentam afinidade pelo DNA têm sido atualmente utilizadas para a avaliação da integridade da membrana plasmática das células espermáticas (SILVA; GADELLA, 2006).

Dentre as sondas fluorescentes que podem avaliar a integridade da membrana, destacam-se o iodeto de Propídeo (IP) e o Diacetato de carboxifluoresceína (DFDA) (JUNIOR, 2011). O DFDA é uma solução não fluorescente que penetra o ambiente celular e é, rapidamente, convertida em carboxifluoresceína pelas esterases intracelulares. A carboxifluoresceína é uma solução altamente fluorescente não permeável que é mantida no meio intracelular na presença de uma membrana plasmática intacta, apresentando a coloração verde. Por outro lado, o IP tem a capacidade de corar o DNA de células que estão mortas ou têm sua membrana danificada, produzindo uma coloração vermelho fluorescente quando excitada (PEÑA *et al.*, 1998).

2.8.3 Análise pelo teste cometa

O ensaio Cometa consiste basicamente na fixação das células espermáticas em gel de agarose e na submissão dessas células a soluções de lise, cujo objetivo é levar ao rompimento das membranas plasmática e nuclear e à exposição do DNA. As lâminas com os espermatozoides fixados e com o DNA disperso são colocadas em câmaras de eletroforese e submetidas a cargas. O DNA irá correr em direção a um dos polos e formará uma cauda. Quanto mais DNA fragmentado, maior será a cauda formada, o que lembra um cometa e dá o nome à técnica (DONNELLY *et al.*, 2000).

Uma variedade de métodos foi desenvolvida para a detecção de danos em fita de DNA, como os micronúcleos e ensaios de troca de cromátides-irmã. Um método mais recente, chamado de eletroforese em gel de célula única ou ensaio cometa, detecta quebras de filamentos de DNA e sítios alcali-lábeis através da mensuração da migração do DNA a partir do DNA nuclear imobilizado (LEE; STEINERT, 2003).

As vantagens do ensaio cometa para avaliar os danos na molécula de DNA incluem: mensuração de danos ao DNA em células individuais; apenas um número pequeno de células é necessário para a realização do ensaio (<10.000); pode ser realizado em praticamente todo tipo de célula eucariótica, pois é um método muito sensível para a detecção de danos ao DNA (LEE e STEINERT, 2003).

2.8.4 Análise ultraestrutural de células espermáticas por microscopia eletrônica

A microscopia eletrônica de espermatozoides é uma ferramenta complementar da análise seminal (PARIZ *et al.*, 2014). Essa análise tem sido intensivamente estudada ao longo de muitos anos, especialmente por microscopia eletrônica de transmissão (ELLIS *et al.*, 2002; JOSHI *et al.*, 2001). As imagens fornecidas possuem um caráter virtual, pois o que é visto no monitor do aparelho é a transcodificação da energia emitida pelos elétrons, ao contrário da radiação de luz natural. Os elétrons secundários fornecem imagem de topografia da superfície da amostra e são os responsáveis pela obtenção das imagens de alta resolução, já os retos espalhados fornecem imagem característica de variação de composição (CABRAL, 2017).

Somente a microscopia eletrônica é capaz de analisar anormalidades não detectáveis pela microscopia óptica, como defeitos da compactação da cromatina, morfologia do acrossoma, estruturas mitocondriais e dos axonemas, frequentemente associadas com teratozoospermia, astenozoospermia e infertilidade idiopática (PARIZ *et al.*, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito do extrato de bromelina sobre a qualidade espermática do sêmen caprino pós-descongelação.

3.2 Específicos

- a) Desenvolver um diluidor/crioprotetor seminal a base de bromelina associada a água de coco em pó (ACP®) para criopreservação de sêmen caprino;
- b) Identificar o efeito da bromelina sobre os parâmetros seminais no sêmen fresco e pós descongelação;
- c) Avaliar por meio de análise computadorizada (CASA) os parâmetros seminais pós descongelação;
- d) Avaliar a viabilidade espermática (integridade de membrana plasmática, membrana acrossomal e atividade mitocondrial) por meio de sondas fluorescentes;
- e) Avaliar o efeito da adição de bromelina sobre a integridade do DNA espermático pós descongelação por meio do teste cometa;
- f) Verificar o efeito da adição da bromelina ao meio diluente sobre a avaliação ultra estrutural das células espermáticas, ressaltando - a integridade morfológica das membranas e organelas dos espermatozoides no momento pós descongelação por meio de microscopia eletrônica de transmissão.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Ética em experimentação animal

Este estudo foi realizado em conformidade com o projeto aprovado na Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA/UESPI) da Universidade Estadual do Piauí, com o número de protocolo nº 0206/2018. Para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei número 11.794 de 08 de outubro de 2008, Decreto número 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pela Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA).

4.2 Local de realização do estudo

O experimento foi realizado no setor de Reprodução Animal do Hospital Veterinário Universitário, Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Petrônio Portela, cidade de Teresina, Estado do Piauí, Brasil, situada à 5°03'23.1" de latitude Sul e 42°47'27.9" de longitude Oeste, com altitude média de 72,7 metros, sendo realizados nesse setor as análises subjetivas do sêmen (turbilhonamento, motilidade, vigor, morfologia, espermática e concentração espermática).

A análise computadorizada do sêmen por meio do sistema CASA foi realizada no Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino (LTSCO), inserido no Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB) da Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, Brasil, com latitude de 3°43'47" sul e longitude de 38°30'37" oeste e altitude de 16 metros acima do nível do mar (IBGE/IPECE, 2019).

O teste cometa para avaliação da integridade do DNA espermático foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular e de Estudos de Injúrias Biológicas – LABMINBIO no Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia e Biodiversidade – NPBio, da Universidade Estadual do Piauí (UESPI), localizado no município de Teresina.

A análise espermática por microscopia eletrônica de transmissão foi realizada no Instituto de Biociências da Universidade de Brasília (UnB - DF).

4.3 Animais e desenho experimental

Foram utilizados cinco caprinos adultos da raça Anglo Nubiana (P.O), oriundos de uma fazenda localizada no município de Campo Maior – PI, situada às coordenadas geográficas 4°51'35,75"S e 42°12'47,18"W. Todos em idade média reprodutivas (5 anos), clinicamente saudáveis e com escore de condição corporal de 3,5, numa escala de (0-5).

Antes do início do experimento os bodes foram submetidos ao exame clínico/reprodutivo de modo a verificar a higidez geral, bem como dos órgãos reprodutivos, conforme estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013; MORANI *et al.*, 2018). Os bodes foram manejados de forma intensiva, em baia coletiva, e a fêmea em baia individual, todos com fornecimento diário de capim elefante (*Penissetum purpureum*) picado (volumoso), concentrado proteico comercial contendo 16% PB (400g/animal/dia), sal mineral específico para caprinos e água *ad libitum*.

A colheita do sêmen foi realizada com o auxílio de uma vagina artificial específica para pequenos ruminantes, pré-aquecida a uma temperatura média de 39°C e acoplada a um tubo coletor graduado, e uma fêmea (manequim) estrogenizada. O sêmen foi colocado em banho-maria à temperatura de 37°C e mantido nessa temperatura durante todo o processo de análise do sêmen. Os parâmetros avaliados foram relacionados ao volume (tubo graduado), aspecto, cor, turbilhonamento (0-5), motilidade (0 a 100%), concentração espermática e morfologia espermática.

Para avaliação microscópica (análise subjetiva), uma alíquota de 5µL de sêmen fresco foi colocada entre uma lâmina e uma lamínula, previamente aquecidas em placa aquecedora a 37°C, para avaliação em microscópio óptico (aumento de 100x e 400x) da motilidade espermática progressiva, expressa em percentagem (0 a 100%), e do vigor espermático (0 a 5), numa escala de 0 (imobilidade) a 5 (rápida mobilidade), de acordo com a metodologia empregada e recomendada pelo manual do Colégio Brasileiro de Reprodução animal - CBRA (2013).

Para o cálculo da concentração espermática, foi utilizada câmara de *Neubauer*, com sêmen diluído na proporção de 5µL para 2mL (1:400) de solução de formol-salina tamponada (HANCOCK, 1957). Após procedida a concentração espermática, por contagem em câmara de *Neubauer*, foi calculado o número de doses

(100 milhões de espermatozoides/dose) e realizado o ajuste do volume final do diluidor a ser adicionado.

Após as análises foi realizado um *pool* dos ejaculados e logo em seguida foi centrifugado a 2.500g, durante 10 minutos para remoção do plasma seminal e substituição por igual volume de PBS.

Utilizou-se 15 *pools* que foram divididos em cinco alíquotas iguais em tubos tipo *falcon* (15mL). Posteriormente foram definidos os seguintes tratamentos experimentais:

Tabela 1 – Descrição do grupo controle e grupos experimentais

Grupo Controle	Bromelina 5%	Bromelina 10%	Bromelina 15%	Bromelina 20%
ACP 101c [®]	ACP 101c [®]	ACP 101c [®]	ACP 101c [®]	ACP 101c [®]
2,5% gema de ovo	2,5% gema de ovo	2,5% gema de ovo	2,5% gema de ovo	2,5% gema de ovo
7% Glicerol	7% Glicerol	7% Glicerol	7% Glicerol	7% Glicerol
40mg Gentamicina	40mg Gentamicina	40mg Gentamicina	40mg Gentamicina	40mg Gentamicina
	5% Bromelina (5mg/mL)	10% Bromelina (10mg/mL)	15% Bromelina (15mg/mL)	20% Bromelina (20mg/mL)

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Colheita e avaliação do sêmen fresco

Foram realizadas 15 (quinze) colheitas seminais de cada reprodutor caprino. O prepúcio dos reprodutores foi devidamente higienizado antes das colheitas, para a remoção de impurezas utilizando solução fisiológica a 0,9%. Realizaram-se as colheitas pelo método de vagina artificial (CBRA, 2013), específica para pequenos ruminantes, aquecida a uma temperatura de 39°C acoplada a um tubo coletor graduado tipo *falcon*. Após cada colheita, o ejaculado foi protegido da incidência direta de luz solar, transportado ao laboratório e mantido em banho-maria à temperatura de 37°C (CBRA, 2013; QIN *et al.*, 2018).

Imediatamente foram realizadas as avaliações subjetivas macroscópicas (volume, cor e aspecto). Posteriormente, procederam-se as avaliações dos parâmetros espermáticos (turbilhonamento, motilidade, vigor, morfologia espermática e concentração espermática).

O turbilhonamento foi avaliado colocando-se uma gota de sêmen sobre uma lâmina previamente aquecida a 37°C observando o movimento em forma de ondas através de um microscópio óptico (aumento de 100x). A interpretação foi expressa em uma classificação de zero a cinco, sendo que zero representa a ausência de movimento e cinco o valor máximo dado a um acentuado movimento de massa (KLINC; RATH, 2007; CBRA, 2013; QIN *et al.*, 2018).

Foi utilizado um microscópio óptico (aumento de 400x) para avaliar a motilidade espermática (escala de 0-100%) e vigor espermático (0-5), sendo colocada uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula previamente aquecidas e mantidas a 37°C. A realização da análise morfológica foi procedida a partir da confecção de lâminas com esfregaço da amostra do sêmen dos bodes e posteriormente coradas pelo método Romanowsky (Panótico® rápido). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (aumento de 400x), e posteriormente, contados 200 espermatozoides por lâmina. Para determinar a concentração espermática o sêmen foi diluído em solução formol:salina (1:200) e a contagem realizada em câmara de *Neubauer* com auxílio de um microscópio (aumento de 400x) (KLINC; RATH, 2007; CBRA, 2013; QIN *et al.*, 2018).

4.5 Diluição, processamento e criopreservação seminal

A fonte da matéria prima (bromelina) foi adquirida da empresa Farmácia Equilíbrio®, onde o processo de extração dessa enzima foi obtido por meio do caule e em seguida foi realizada a purificação e padronização. O Diluidor/crioprotetor (ACP®) foi adquirido através da empresa ACP-Biotecnologia®. O crioprotetor Glicerol foi obtido da Sigma Aldrich Chemical Company®.

Foram adicionados dois mililitros de diluente para cada grupo experimental. Em seguida, foram envasadas em cada grupo, oito palhetas francesas de 0,25 mL (IMV Technologies, Campinas, São Paulo, Brasil) contendo 80×10^6 espermatozoides viáveis.

O processo de criopreservação foi realizado utilizando um congelador automatizado programável TK 3000® (TK Tecnologia em Congelação LTDA, Uberaba, Brasil), seguindo-se as instruções do fabricante, selecionando a curva rápida (0,5°C/min até 5°C; 15°C/min até -20°C e 10°C/min até -120°C). Posteriormente, as

amostras foram imersas em nitrogênio líquido (-196°C) e, armazenadas em raques em botijões criogênicos (SILVA et al., 2015; ARANGASAMY *et al.*, 2018).

Após o período mínimo de uma semana as amostras foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos, acondicionadas em microtubos tipo *ependorf* e homogeneizadas para a análise computadorizada (CASA®).

4.6 Análise espermática auxiliada por computador (CASA) pós-descongelção

Após o período mínimo de uma semana as amostras foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos, acondicionadas em microtubos tipo *ependorf* e homogeneizadas para a análise imediata (CABRERA *et al.*, 2013; ARANGASAMY *et al.*, 2018).

As análises do sêmen pós-descongelção foram realizadas no Núcleo Integrado de Biotecnologia da UECE por meio do sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analyses), utilizando Software Sperm Class Analyser® (SCA) (Microptics, SL, versão 3.2.0, Barcelona, Espanha). Para proceder as análises uma amostra de 10 µL de sêmen descongelado foi diluída em 50 µL de meio ACP-101c/102c® (3,25 g; 50 mL de água destilada). Em seguida 10 µL dessas diluições foram inseridas na câmara de Makler previamente aquecida a 37°C e avaliado com auxílio de microscópio de contraste de fase acoplado a uma vídeo-câmera adaptada ao sistema (Nikon™ H5505, Eclipse 50i, Japão).

Foram utilizados os parâmetros do programa: velocidade limite para espermatozoides lentos: 30µm/s; limite para velocidade média: 60µm/s; retilinearidade mínima para espermatozoides progressivos: 80%, capturados em três campos.

Os parâmetros avaliados incluíram: motilidade total (MT-%), motilidade progressiva (MP), velocidade curvilínea (VCL-µm/s), velocidade em linha reta (VSL-µm/s), velocidade média do percurso (VAP-µm/s), linearidade (LIN-%), deslocamento lateral de cabeça (ALH-µm), índice de oscilação ou wobble (WOB-%) e frequência de batimento cruzado (BCF-Hz), retilinearidade (STR-%) individual para cada célula espermática.

4.7 Análise morfológica das células espermáticas

A análise dos defeitos espermáticos maiores e menores foram realizados utilizando o corante panótico rápido[®] segundo o método de Hidalgo et al. (2006) adaptado, onde 10 µL de sêmen de cada amostra foi depositado em uma lâmina previamente identificada e realizado o esfregaço, logo após submergiu-se as lâminas nas soluções 1 (fixador), 2 (corante) e 3 (corante) (Renylab[®]) mantendo-se em movimento contínuo de cima para baixo durante cinco segundos e deixou-se escorrer na posição vertical. A avaliação morfológica foi realizada com auxílio de um microscópio óptico com aumento de 1000x, sendo contadas 200 células (CBRA, 2013).

4.8 Análise da integridade de membrana plasmática, membrana acrossomal e atividade mitocondrial pós-descongelção

Imediatamente após a descongelção, cada amostra foi acondicionada em microtubos em banho maria a 37°C. A integridade da membrana plasmática foi avaliada com o uso de sondas fluorescentes, conforme descrito por Harrison e Vickers (1990), alíquotas de 50 µL de sêmen, descongeladas a 37°C por 30 segundos e acondicionados em microtubos, foram diluídas em 150 µL de TRIS (3,786g de Tris hidroximetil aminometano; 2,0g de ácido cítrico; 1,0g de frutose; 100 mL de água destilada) contendo 5 µL de Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF; Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA) (0,46 mg/mL em DMSO) e 20 µL de Iodeto de Propídio (IP; Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA) (0,5 mg/mL em PBS), e incubadas por 10 minutos a 37°C para posterior avaliação. A análise se deu pela contagem de 100 espermatozoides em microscópio de epifluorescência (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão) em aumento de 1000 vezes, sob óleo de imersão usando filtro de emissão DBP 580- 630nm e excitação DBP 485/20nm. As células que apresentaram fluorescência verde foram consideradas íntegras, enquanto aquelas apresentando fluorescência vermelha foram consideradas danificadas.

A atividade mitocondrial foi determinada pela utilização de um fluorocromo catiônico lipofílico JC-1 (GUTHRIE; WELCH, 2006). Para tanto, alíquotas de 50µL de sêmen pós-descongelado foram diluídas em 150µL de TRIS contendo 5µL de JC-1 (0,15mM em DMSO) e incubadas por 10 minutos a 37°C. Um total de 200

espermatozoides foi avaliado em microscópio de epifluorescência (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão), com aumento de 1000x, sob óleo de imersão, usando-se filtro de emissão LP 515nm e BP 450 - 490nm para excitação. As células coradas em laranja foram classificadas com alto potencial de membrana mitocondrial, enquanto aquelas coradas em verde foram classificadas com baixo potencial de membrana.

4.9 Teste cometa – análise da interidade do DNA espermático

A análise do DNA foi realizada pelo ensaio cometa, onde as amostras de sêmen foram descongeladas e transferidas para microtubos contendo 120 mL de agarose de baixo ponto de fusão (1,5%) a 37°C. Posteriormente a mistura foi homogeneizada e transferida para lâminas pré-revestidas com 5% de agarose.

Em seguida, as lâminas foram cobertas com lamínulas e colocadas a 3°C durante 20 minutos. As lamínulas foram removidas e as lâminas imersas em solução de lise por 48h. As lâminas foram colocadas numa cuba de eletroforese contendo uma solução tampão, para a desnaturação do DNA. Realizou-se a eletroforese e as lâminas foram então neutralizadas e, em seguida, foram secas e armazenadas para análise posterior. Finalmente, as lâminas foram coradas com GelRed® (50µl) na diluição de 1µl para 10.000µl de água destilada e cobertos com uma lamínula. As avaliações foram feitas em microscópio de imunofluorescência num aumento de 40x, num ensaio cego. Foram contabilizadas 200 células por amostra. As formas dos cometas seguiram um padrão estabelecido no laboratório. Foram utilizadas classes de 0 a 3, sendo 0 nenhum dano e três, cauda do cometa superior a duas vezes o tamanho do nucleóide. A partir destes dados calculou-se o Índice de Danos e a Frequência de Danos, variando de 0 (ausência de danos) até 100 (dano máximo).

4.10 Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão

Para avaliação de danos na ultraestrutura das amostras de espermatozoides congelados em diferentes meios, usou-se a microscopia eletrônica de transmissão (MET) (BURGESS et al., 2001), em que as amostras do sêmen foram descongeladas a 37°C e lavadas em PBS a 37°C. As amostras foram centrifugadas a 5.000 g e fixadas em glutaraldeído (2,5%) em tampão fosfato (0,1M). Em seguida, as amostras de sêmen foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio em tampão fosfato,

contrastadas em bloco com acetato de uranila (2,5%), submetidas à desidratação em séries crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) por 15 minutos em cada etapa. As amostras, posteriormente foram mantidas por 12 horas em mistura acetona e resina Epon. As amostras foram transferidas para resina pura onde ficou por mais 12 horas. Finalmente foram incluídas em resina Epon (Sigma, Saint Louis, MO, USA) em suporte de silicone e colocadas para polimerização em estufa a 65°C. Foram realizados cortes ultrafinos em ultramicrótomo EM UC6 (Leica, Wetzlar, Germany) em corte de 70nm. Os cortes foram coletados em grades de cobre e contrastados em acetato de uranila (5%) por 1h15min e citrato de chumbo por 4min, e estocado em dissecador até o momento da avaliação em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL - modelo JEM 1011, Tokyo, Japan) equipado com câmara CCD Gatan (California, USA).

4.11 Análises estatísticas

Os dados foram descritos em médias e desvios padrão. Os dados foram analisados pela ANOVA e as médias comparadas teste PLSD de Fisher. Somente o vigor foi avaliado pelo teste de Kruskal Wallis. As diferenças foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$. Na correlação estatística do Ensaio Cometa para o índice de dano ao DNA espermático pós criopreservação foi utilizado o teste de Mann-Whitney. As análises da avaliação espermática por microscopia eletrônica de transmissão foram apresentadas de forma descritiva.

5 RESULTADOS

Os dados referentes à motilidade e vigor do sêmen fresco (grupo controle) estão descritos na tabela 2. Neste estudo, pode-se observar uma redução significativa ($P < 0,05$) da motilidade e vigor nos grupos tratamentos em comparação ao grupo controle. Dentre os grupos testados, o uso de 5% de bromelina proporcionou melhor motilidade espermática após a diluição, quando comparado à concentração de 20% de bromelina.

Tabela 2 – Média e desvio padrão da motilidade e vigor espermático do sêmen caprino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) acrescido ou não de extrato de bromelina e avaliado após cinco minutos de incubação em banho Maria a 37 °C

GRUPOS	Sêmen caprino fresco diluído em ACP-101c	
	MOTILIDADE (%)	VIGOR (0-5)
ACP-101c (controle)	57,33 ± 22,90 ^a	3,20 ± 0,78 ^a
ACP-101c + Bromelina 5%	36,67 ± 20,59 ^b	2,07 ± 0,46 ^b
ACP-101c + Bromelina 10%	27,00 ± 20,60 ^{bc}	2,07 ± 0,46 ^b
ACP-101c + Bromelina 15%	22,00 ± 18,59 ^{bc}	2,00 ± 0,38 ^b
ACP-101c + Bromelina 20%	15,67 ± 16,13 ^c	1,73 ± 0,70 ^b

Letras diferentes entre linhas na mesma coluna indicam diferença estatística $P < 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os parâmetros da cinética espermática do sêmen caprino criopreservado em diferentes concentrações de bromelina estão descritos nas tabelas 3a, 3b.

Após a descongelação, a motilidade espermática total avaliada pelo sistema CASA foi mais bem preservada no grupo controle e no grupo utilizando a concentração de 5% em comparação ao uso da maior concentração, que foi a de 20%.

Os parâmetros velocidade curvilínea (VCL) e velocidade média da trajetória (VAP) e velocidade linear progressiva (VSL) dos espermatozoides foram maiores no grupo controle ($P < 0,05$) em comparação aos grupos experimentais. Dentre estes, a velocidade espermática foi menor no grupo bromelina a 20%.

Neste estudo, verificou-se que a linearidade (LIN) foi maior no grupo controle quando comparado aos grupos contendo 5, 10 e 20% de bromelina.

Entretanto, não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) entre as diferentes concentrações da bromelina no meio diluente sobre este parâmetro espermático.

Tabela 3a – Média e desvio padrão da cinética espermática do sêmen caprino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) acrescido ou não de extrato de bromelina pós-descongelção

GRUPOS	MT (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)
ACP-101c (controle)	21,39 \pm 15,36 ^{acd}	75,74 \pm 14,14 ^a	57,90 \pm 14,77 ^a	64,97 \pm 15,32 ^a
ACP-101c + Bromelina 5%	33,23 \pm 27,15 ^{ac}	55,46 \pm 18,00 ^b	37,03 \pm 16,23 ^b	45,18 \pm 18,50 ^b
ACP-101c + Bromelina 10%	21,44 \pm 21,42 ^{cd}	53,41 \pm 16,15 ^{bc}	33,45 \pm 14,69 ^b	41,94 \pm 16,00 ^{bc}
ACP-101c + Bromelina 15%	14,97 \pm 16,13 ^{bd}	55,90 \pm 13,39 ^b	37,67 \pm 15,43 ^b	47,63 \pm 16,41 ^b
ACP-101c + Bromelina 20%	6,73 \pm 7,66 ^b	43,42 \pm 17,59 ^c	27,27 \pm 16,11 ^b	33,32 \pm 17,07 ^c

Letras diferentes entre linhas na mesma coluna indicam diferença estatística $P < 0,05$. MT = Motilidade total; VCL = Velocidade curvilínea; VSL = Velocidade retilínea; VAP = Velocidade média do percurso.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 3b – Média e desvio padrão da cinética espermática do sêmen caprino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) acrescido ou não de extrato de bromelina após descongelção

GRUPOS	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)
ACP-101c (controle)	73,92 \pm 9,38 ^a	86,31 \pm 5,02 ^a	85,49 \pm 6,97 ^a
ACP-101c + Bromelina 5%	63,57 \pm 12,41 ^b	79,77 \pm 8,50 ^{ab}	79,12 \pm 9,67 ^{ab}
ACP-101c + Bromelina 10%	60,94 \pm 13,51 ^b	78,10 \pm 9,32 ^b	77,28 \pm 10,34 ^b
ACP-101c + Bromelina 15%	65,15 \pm 14,77 ^{ab}	82,16 \pm 8,07 ^{ab}	78,37 \pm 12,12 ^{ab}
ACP-101c + Bromelina 20%	58,03 \pm 18,28 ^b	77,11 \pm 14,09 ^b	73,29 \pm 14,66 ^b

Letras diferentes entre linhas na mesma coluna indicam diferença estatística $P < 0,05$. LIN: Linearidade; STR: Retilínearidade; WOB: Amplitude lateral de cabeça.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A retilinearidade (STR) e WOB também foram significativamente superiores ($P < 0,05$) no grupo controle em comparação aos grupos experimentais de bromelina a 5%, 10%, 15% e 20%. Assim como em outros parâmetros, não foi verificada influência da concentração da bromelina.

Os dados referentes à avaliação das membranas plasmática e acrossomal, e atividade mitocondrial por meio de sondas fluorescentes estão descritos na tabela 4.

Tabela 4 – Média e desvio padrão dos percentuais de membrana plasmática e acrossomal íntegra e mitocôndria com potencial, de sêmen caprino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) acrescido ou não de extrato de bromelina pós-descongelamento

GRUPOS	MEMBRANA ÍNTEGRA	MITOCÔNDRIA COM POTENCIAL	ACROSSOMA ÍNTEGRO
ACP-101c (controle)	42,80 ± 17,94 ^a	34,40 ± 22,74 ^a	43,13 ± 16,73 ^a
ACP-101c + Bromelina 5%	53,60 ± 17,39 ^{ab}	40,87 ± 20,18 ^{ab}	39,73 ± 19,54 ^{ab}
ACP-101c + Bromelina 10%	64,60 ± 19,93 ^b	53,80 ± 23,16 ^b	37,40 ± 15,72 ^{ab}
ACP-101c + Bromelina 15%	52,53 ± 23,72 ^{ab}	46,60 ± 24,91 ^{ab}	40,27 ± 15,55 ^{ab}
ACP-101c + Bromelina 20%	40,73 ± 23,31 ^{ac}	39,40 ± 22,31 ^{ab}	30,67 ± 11,91 ^b

Letras diferentes entre linhas na mesma coluna indicam diferença estatística $P < 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A membrana plasmática das células espermáticas do grupo controle apresentou melhor integridade quando comparada aos grupos com a bromelina 10% e bromelina 20% ($P < 0,05$). O potencial mitocondrial também foi superior no grupo controle em relação aos grupos experimentais - contendo 5%, 10%, 15% e 20% de bromelina. A integridade acrossomal foi superior no grupo controle em comparação aos grupo experimentais. Nestes dois últimos parâmetros, não foi observado influência da concentração de bromelina nos grupos.

Quanto à morfologia espermática os dados estão descritos na tabela 5. A ocorrência de defeitos maiores foi superior no grupo controle quando comparado aos demais. Quanto aos defeitos menores, verificou-se que não houve influência da composição do diluente na ocorrência desse tipo de alteração espermática ($P > 0,05$). A presença de defeitos totais foi significativamente menor ($P < 0,05$) no grupo contendo 20% de bromelina. A morfologia espermática foi mais bem preservada ($P < 0,05$) no

grupo contendo 15% de bromelina em comparação ao grupo contendo 20% deste mesmo componente no diluente seminal, nos demais grupos não houvera diferença estatística.

Tabela 5 – Média e desvio padrão dos percentuais da morfologia espermática do sêmen caprino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) acrescido ou não de extrato de bromelina pós-descongelção

GRUPOS	DEFEITOS MAIORES	DEFEITOS MENORES	DEFEITOS TOTAIS	NORMAIS
ACP-101c (controle)	2,20 ± 1,99 ^a	3,80 ± 1,57 ^a	6,00 ± 2,56 ^a	89,20 ± 3,75 ^{ab}
ACP-101c + Bromelina 5%	0,07 ± 0,26 ^b	5,33 ± 1,96 ^a	5,40 ± 1,87 ^{ab}	89,27 ± 2,69 ^{ab}
ACP-101c + Bromelina 10%	0,20 ± 0,41 ^b	5,17 ± 1,48 ^a	5,37 ± 1,34 ^{ab}	89,00 ± 2,36 ^{ab}
ACP-101c + Bromelina 15%	0,07 ± 0,26 ^b	5,43 ± 1,15 ^a	5,50 ± 1,18 ^{ab}	91,27 ± 6,88 ^a
ACP-101c + Bromelina 20%	0,07 ± 0,26 ^b	4,30 ± 3,47 ^a	4,37 ± 3,44 ^b	88,00 ± 5,11 ^b

Letras diferentes entre linhas na mesma coluna indicam diferença estatística $P < 0,05$.

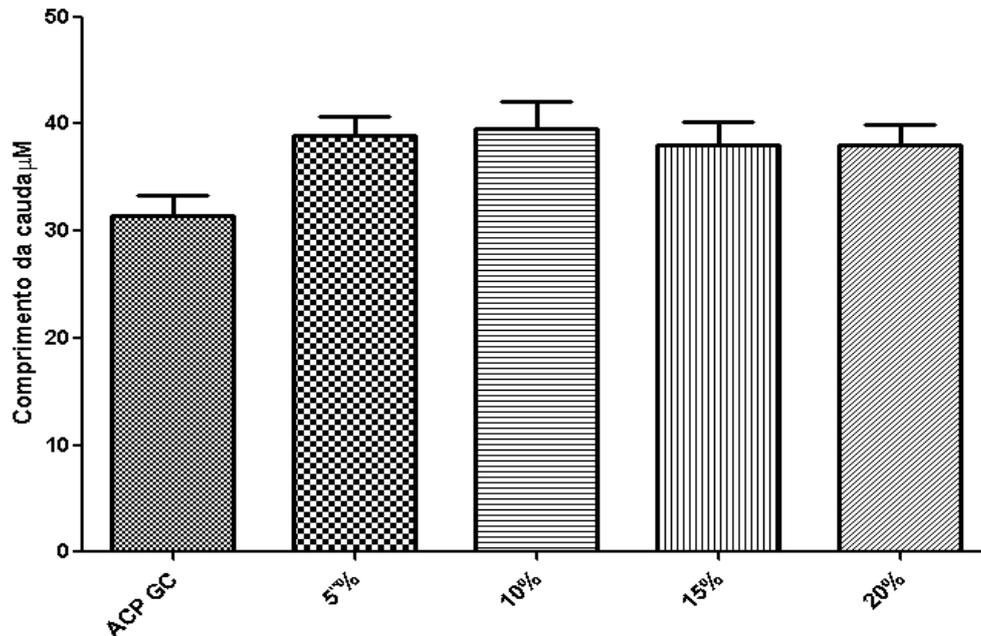
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados referentes à integridade do DNA espermático pelo teste cometa estão descritos na figura 1. Observou-se que não foi possível identificar diferenças significativas entre o comprimento da cauda do DNA de espermatozoides criopreservados do grupo controle e dos grupos contendo 5%, 10%, 15% e 20% de bromelina. Fato este relevante, haja vista, que o extrato de bromelina acrescido ao meio diluente, não apresentou comportamento genotóxico às células espermáticas, tornando-a uma alternativa promissora na criobiologia do sêmen caprino.

O percentual de fragmentação de DNA das células espermáticas oriundas do sêmen caprino pós-descongelção, encontra-se demonstrado na figura 2.

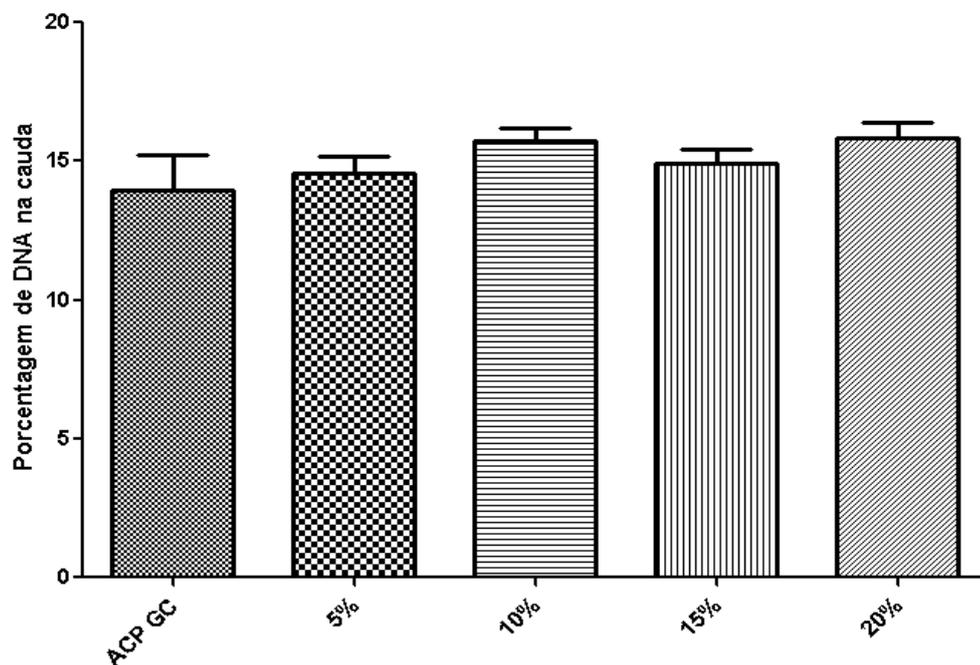
Na figura 2 é possível verificar o percentual de fragmentação de DNA no grupo controle e nos grupos experimentais (bromelina a 5%, 10%, 15% e 20%). As diferentes concentrações de bromelina não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle. Dessa forma, pode-se afirmar que a adição de bromelina em meio diluente, não compromete a cromatina de células espermáticas pós-descongelção.

Figura 1 – Comprimento da cauda do cometa, referente à fragmentação do DNA de espermatozoides oriundos do sêmen caprino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) acrescido ou não de extrato de bromelina pós-descongelamento



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 2 – Percentual de fragmentação do DNA de espermatozoides oriundos do sêmen caprino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) acrescido ou não de extrato de bromelina pós-descongelamento



Fonte: Elaborado pelo autor.

Na análise ultraestrutural das células espermáticas pós-descongelamento foi possível verificar que houve alterações na ultraestrutura dessas células nos grupos experimentais (bromelina 5% e 10%), como, por exemplo, deslocamento de membrana com comprometimento de acrossoma, perda de cromatina e descontinuidade da membrana plasmática (figura 4 e 5). As células espermáticas oriundas do grupo controle mantiveram-se íntegras quanto a sua ultraestrutura (figura 3).

Figura 3 – Análise ultraestrutural de espermatozoide criopreservado em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) sem adição de bromelina (grupo controle) através de microscopia eletrônica de transmissão

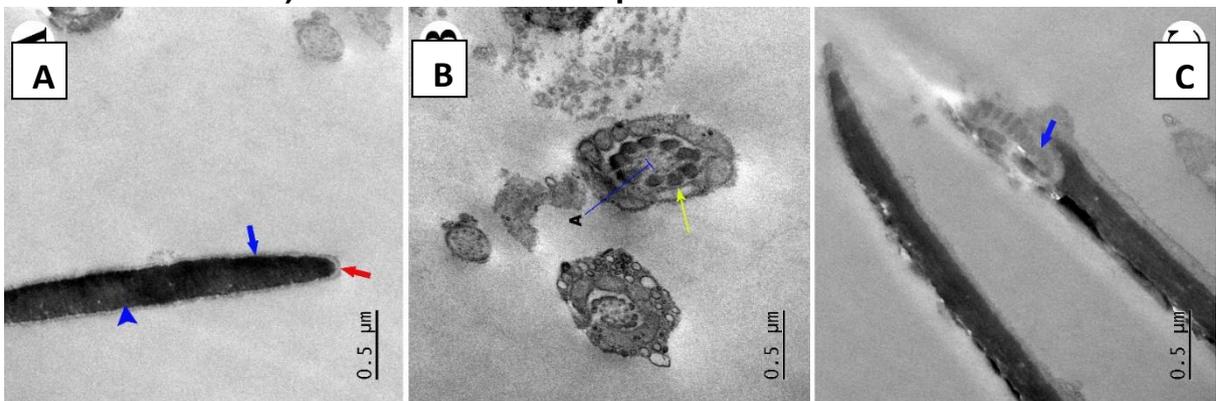


Imagem **A**: mostra região da cabeça do espermatozoide bem preservada com membrana íntegra (seta azul), cromatina com aspecto ultraestrutural típico em corte longitudinal e região do acrossoma (seta vermelha) também com aspecto ultraestrutural íntegro. Imagem **B**: mostra em corte transversal a região de transição entre peça intermediária e flagelo, colar de mitocôndrias (seta amarela) e axonema (indicado pela letra A) com aspecto ultraestrutural típico. Imagem **C**: mostra centríolo com aspecto preservado em corte longitudinal. Estes resultados sugerem do ponto de vista ultraestrutural que o meio em que esta amostra foi preservada conferiu o mais alto grau de crioproteção dentre as amostras analisadas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4 – Análise ultraestrutural de espermatozoide criopreservado em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) com adição de extrato de bromelina 5% através de microscopia eletrônica de transmissão

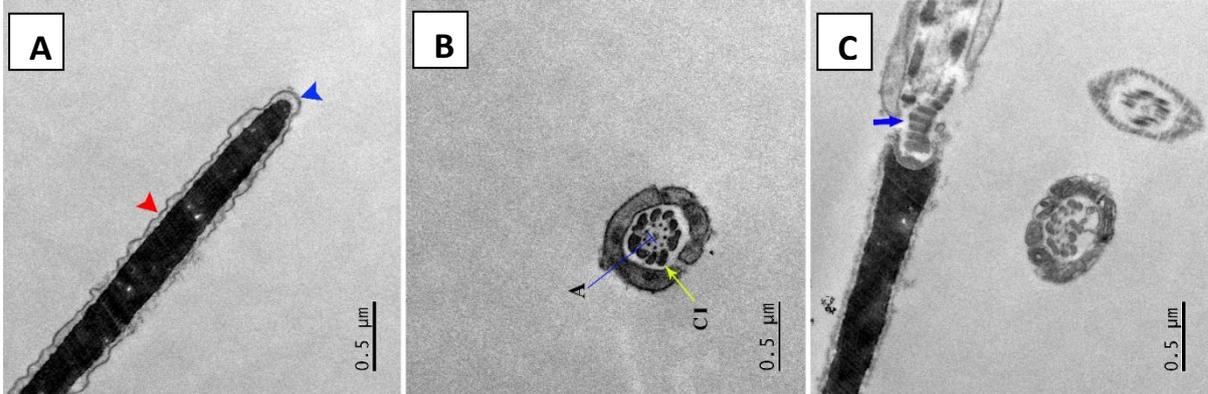


Imagem **A**: mostra descolamento da membrana (seta vermelha) da célula na região da cabeça do espermatozóide, com comprometimento da região de acrossoma (cabeça de seta azul). Perda de cromatina representada por pontos claros eletrólucidos distribuídos pela região da cabeça. Imagem **B**: mostra região de transição entre peça intermediária e flagelo, colar de mitocôndrias (indicado por CI) e axonema (indicado pela letra A) ultraestruturalmente preservados. Imagem **C**: apresenta centríolo em corte longitudinal preservado ultraestruturalmente. Esta amostra mostrou-se de preservação intermediária, apresentando células bem preservadas e células preservadas na região da peça intermediária e flagelo e pouco preservadas na região da cabeça.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 5 – Análise ultraestrutural de espermatozoide criopreservado em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) com adição de extrato de bromelina 10% através de microscopia eletrônica de transmissão

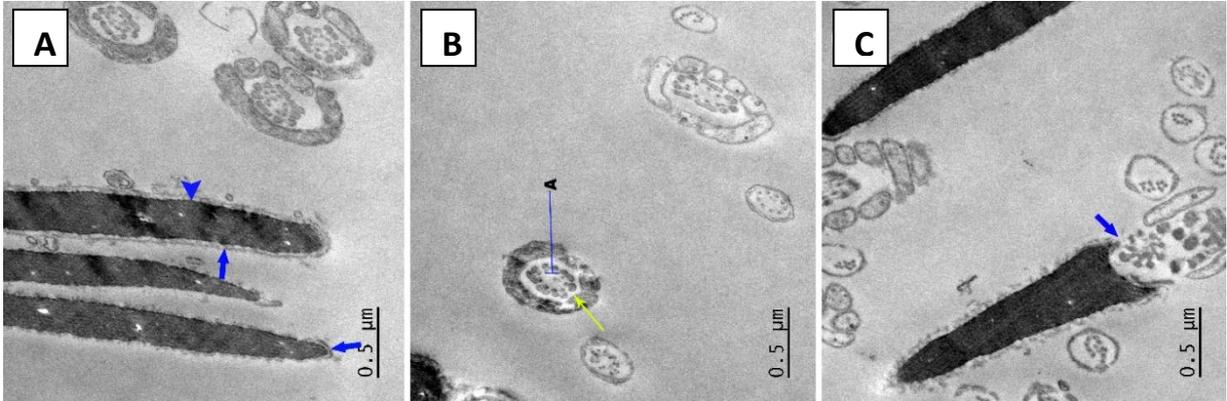


Imagem **A**: Mostra que a membrana plasmática, região do acrossoma (setas) e cromatina (eletrondenso) estão conservados. No entanto algumas células apresentam descontinuidade de membrana cabeça de seta. Foi ainda observado diversos debris celulares no formato de anéis simples ou compostos o que indica ruptura de membrana e auto selamento em meio aquoso. A ruptura de membrana representa a inviabilidade para este tipo celular. Imagem **B**: mostra a baixa preservação das células representada pelo colar de mitocôndrias próximo ao axonema. As imagens sugerem perda de conteúdo celular, ficando apenas restos de estruturas de membrana e elementos do citoesqueleto. Seta indica parte do colar de mitocôndrias e a letra A mostra o axonema. Imagem **C**: Mostra a região dos centríolos (seta) também com aspecto desorganizado, pouco denso em descontinuidade com a cromatina. Este aspecto indica ruptura e perda de conteúdo celular. Próximo a estas células encontramos diversos debris celulares constituídos apenas de membrana com elementos internos que sugerem restos de mitocôndrias e elementos do citoesqueleto. De forma geral foi identificada nesta amostra um estado de baixa preservação celular.

Fonte: Elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

Os parâmetros motilidade e vigor no sêmen fresco e no grupo controle foram superiores aos grupos experimentais contendo bromelina (5%, 10%, 15% e 20%). Essa variação encontrada pode ser decorrente da presença de enzimas proteolíticas no extrato de bromelina. Apesar disso, a bromelina é rica em oligossacarídeos e aminoácidos como a valina e glicina, os quais são essenciais no processo de criopreservação (COSTA, 2014). As enzimas encontradas na bromelina atualmente vêm sendo muito requeridas em processos industriais e biotecnológicos, possuindo grande relevância no mercado mundial (CHAPMAN, 2018).

De acordo com NOGUEIRA (2017), uma das grandes vantagens da adição de substâncias aos crioprotetores, como, por exemplo, substâncias ricas em aminoácidos é a melhora significativa na qualidade seminal e capacidade fertilizante dos espermatozoides descongelados. Fato este que corrobora com a utilização do extrato de bromelina neste estudo.

A análise seminal computadorizada (CASA) contribuiu de forma expressiva para a compreensão dos resultados obtidos, pois de acordo com OLIVEIRA et al. (2013) esse sistema fornece diversas informações sobre os parâmetros, como a motilidade dos espermatozoides e entre outros.

A concentração de 5% de bromelina apresentou resultados promissores para o parâmetro motilidade total (MT), apresentando resultados semelhantes aos do grupo controle. No entanto, os resultados apresentam-se abaixo do mínimo exigido para aplicação em programas de biotecnologias reprodutivas como a inseminação artificial.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que quanto maior a concentração de bromelina menor é a qualidade seminal pós-descongelação. Essa afirmação pode ser atribuída ao poder proteolítico da bromelina, que pode gerar efeitos indesejáveis aos espermatozoides quando administrada em maiores concentrações aos diluidores seminais (TAP *et al.*, 2016).

De acordo com SAYALI et al. (2013), essas enzimas funcionam como catalizadores biológicos, que são responsáveis por realizar catalização de reações em organismos vivos. Dessa forma, por se tratar de uma enzima catalizadora a sua principal função é acelerar o metabolismo das células. Fato este que pode gerar um efeito indesejado aos espermatozoides, uma vez que o consumo de energia será

grande no início (hiperativação), fazendo com que as reservas de ATP se esgotem rapidamente, levando assim a uma diminuição no seu poder de fertilização. No entanto, esse efeito não foi observado neste estudo, uma vez que os valores de VCL e VSL estão dentro da normalidade que é de até 100 $\mu\text{m/s}$. Um indicativo de hiperativação só ocorre quando esses valores se encontram acima de 250 $\mu\text{m/s}$.

A hiperativação apesar de ser benéfica e essencial é uma característica limitante, pois só deve ocorrer nas proximidades do local de fertilização (região ampolar do oviduto). Dessa forma, a ativação prematura reduz o tempo de vida útil do espermatozoide, diminuindo as chances de fecundação (VERSTEGEN *et al.*, 2002). Nesse sentido, é possível inferir que o efeito catalizador da bromelina não exerceu um efeito indesejável às células espermáticas.

Vale salientar que não só a adição da bromelina, em meios diluentes, contribuiu para a redução dos parâmetros espermáticos e alterações na ultraestrutura dos espermatozoides pós-descongelação, mas também o processo de criopreservação, uma vez que crioinjúrias contribuem negativamente a ocorrência de alterações na estrutura dos espermatozoides, influenciando conseqüentemente nos parâmetros espermáticos.

No parâmetro velocidade média de percurso (VAP) o grupo controle apresentou resultados superiores aos grupos experimentais, no entanto, os valores encontrados neste trabalho não ultrapassaram 64,97 $\mu\text{m/s}$. a enzima catalase onde verificaram uma velocidade de 93 $\mu\text{m/s}$.

Os resultados para o parâmetro linearidade (LIN) foi significativamente superior no grupo controle quando comparado aos grupos experimentais. E de acordo com VERSTEGEN *et al.* (2002) esse parâmetro tem uma correlação positiva com a taxa de prenhes. Entretanto, os valores dos grupos testados ainda apresentaram-se dentro dos padrões exigidos, não interferindo, dessa forma, em uma possível taxa de prenhes.

Para o parâmetro retilinearidade (STR) os valores encontrados no grupo controle também foram superiores aos encontrados nos grupos experimentais. Porém, os valores obtidos encontram-se dentro dos padrões esperados. LEITE *et al.* (2011) relataram que altos valores de retilinearidade é bastante desejável, uma vez que demonstram que o trajeto da célula espermática é mais uniforme e com menor amplitude, sendo os resultados encontrados para esse parâmetro, neste estudo, bastante satisfatórios.

No que se refere à morfologia espermática a porcentagem de espermatozoides normais em todos os grupos está dentro dos padrões estabelecidos pelo (CBRA, 2013). NASCIMENTO et al. (2016) relataram que o processo de criopreservação pode influenciar drasticamente nesse parâmetro, no entanto, neste trabalho, o processo de criopreservação não influenciou negativamente na morfologia dos espermatozoides.

Em relação ao potencial mitocondrial e integridade do acrossoma não foi verificada influência da concentração de bromelina nos grupos utilizando esse componente do meio de preservação seminal, porém, o grupo controle apresentou uma tendência a melhores resultados na integridade de membrana.

Neste estudo, foi observado integridade de membrana plasmática em algumas células espermáticas analisadas em microscopia de transmissão do grupo bromelina a 10%. De acordo com NASCIMENTO et al. (2016), a adição de substâncias que levam a manutenção da integridade de membrana é extremamente importante em processos de criopreservação seminal, corroborando com o resultado encontrado nesta pesquisa.

A baixa fertilidade do sêmen descongelado é atribuída, em grande parte, a alterações nas membranas plasmáticas, acrossomais e mitocondriais, durante o processo de congelamento e descongelamento (MEDINA *et al.*, 2000). Neste contexto, as análises através de sondas fluorescentes tornam-se essenciais para verificar se há ou não alterações que possam tornar os espermatozoides inaptos à fertilização (LIMA *et al.*, 2015).

O DNA espermático possui papel essencial na reprodução dos mamíferos domésticos (ALVES *et al.*, 2015). E o ensaio cometa é uma técnica utilizada para avaliar a fragmentação do DNA de células espermáticas, sobretudo, quando estas são submetidas a processos de criopreservação, a novos crioprotetores e novas formulações de meios diluentes (ALVES *et al.*, 2015). No entanto, mesmo apresentando resultados relevantes, essa técnica não é realizada rotineiramente. Por isso, neste estudo, o ensaio cometa foi um dos testes elencados como essenciais, para avaliação da integridade do DNA espermático.

As concentrações mais elevadas de bromelina podem ter contribuído para o aparecimento dos defeitos encontrados na ultraestrutura das células espermáticas, como, por exemplo, em nível de cabeça, peça intermediária e cauda. Segundo PARIZ et al. (2014) relataram que essas lesões interferem diretamente nos parâmetros espermáticos e conseqüentemente com a capacidade de fertilidade dos espermatozoides, corroborando assim os resultados deste trabalho.

7 CONCLUSÃO

O uso do extrato de bromelina em meio diluidor/crioprotetor de sêmen caprino caracteriza-se como uma substância promissora, contribuindo significativamente para a integridade do DNA espermático. No entanto, mais estudos são necessários para validação e determinação da concentração ideal da bromelina, para a efetivação de seu uso na composição de meios diluidores/crioprotetores, visando a criopreservação seminal.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os valores encontrados para os parâmetros seminais estão dentro dos padrões estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Contudo, novos estudos são necessários a fim de aperfeiçoar e validar o uso da bromelina em tecnologias reprodutivas como a criopreservação seminal.

Além disso, mesmo por se tratar de uma enzima catalizadora, neste estudo, foi possível observar que a bromelina além de ser um bom insumo biotecnológico para diversos outros segmentos farmacológicos é um produto seguro para as células espermáticas.

9 PERSPECTIVAS

Devido aos seu baixo custo e facilidade de acesso o uso da bromelina adicionada aos diluidores/crioprotetores seminais poderá se tornar mais uma alternativa mercadológica para biotécnicas aplicadas a reprodução animal.

REFERÊNCIAS

- ALVES, M.B.R.; OLIVEIRA, M.L.; LANÇONI, R.; FLOREZ-RODRIGUEZ, S.A.; CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C. Investigando a compactação e a fragmentação não induzida do DNA espermático:refinamento da avaliação espermática – parte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.39, p.263-269, 2015.
- AMANN, R.P.; WABERSKI, D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. **Theriogenology**, v.81, p.5-17, 2014.
- AMANN, R.; KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v. 25, p.317-325, 2004.
- ANDRABI, S.M.S. Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 24, p. 561-569, 2007.
- ARAGAO, W.M.A. **Importancia do coqueiro-anao verde**. Disponível em: <http://www21.sede.embrapa.br/noticias/artigos/2000/artigo.20041207.2461636373/mostraartigo>. Acesso em: 11 mar. 2020
- ASMA-UL-HUSNA, A.U.H.; ANSARI, M.S.; ALLAH RAKHA, B.; EJAZ, R.; ULLAH, N.; AKHTER, S. Melatonin supplementation in extender enhances the post thaw quality of buffalo bull spermatozoa. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 49, p.163–167, 2017.
- BALA, M.; ISMAIL, N. A.; MEL, M.; SAEDI, M.; SALLEH, H. M.; SALLEH, A.; AMID, A. Bromelain production: current trends and perspective. **Archives des Sciences**, v. 65, p. 369-399, 2012.
- BATISTA, A.M.; GUERRA, M.M.P. Novas técnicas para avaliação da qualidade do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p.125-132, 2010.
- BITTENCOURT, R.F.; OBA, E.; FILHO, A.L.R.; CHALHOUB, M.; AZEVEDO, H.C.; BICUDO, S.D. Avanços na criopreservação do sêmen ovino I: Diluidores e crioprotetores. **Ciência Animal Brasileira**, v.14, p.522-536, 2013.
- BROMELAIN. Monograph. **Alternative Medicine Review**, v.15, p.361-368, 2010.
- CABRAL, M.A. **Avaliação ultraestrutural e funcional do espermatozoide humano submetido ao processo de liofilização**. 2014. 81f. Tese (Doutorado em Saúde da Mulher) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.
- CESAR, A.C.W. **Análise de viabilidade econômica de um processo de extração e purificação da bromelina do abacaxi**. 2005. 145f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade de Campinas, Campinas, 2005.
- CHAPMAN, J.; ISMAIL, A.E.; DINU, C.Z. Industrial applications of enzymes: recent advances, techniques, and outlooks. **Catalysts**, v.8, p.238, 2018.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**, 3. ed., Belo Horizonte: CBRA, 2013.

COSTA, Helber Barcellos. **Desenvolvimento de Processo para a Purificação de Bromelina a partir de Resíduos de Abacaxizeiro (Ananas Comosus var. Comosus)** cv. Vitória. 2014. 150 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Cenário mundial e nacional da caprinocultura e ovinocultura. Boletim ativos de ovinos e caprinos**. 2. ed. [S.l.]: EMBRAPA, 2016.

GARCIA, J.C.; DOMINGUEZA, J.C.; PENA, F.J.; ALEGRE, B.; GONZALEZ, R.; CASTRO, M.J.; HABING, G.G.; KIRKWOOD, R.N. Thawing boar semen in the presence of seminal plasma: Effects on sperm quality and fertility. **Animal Reproduction Science**, v.119, p.160–165, 2010.

GIL, J.; RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M.; LUNDEHEIM, N.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ MARTINEZ, H. 2003. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell and used for cervical artificial insemination. **Theriogenology**, v.59, p.1157-1170.

HANCOCH, J. L. The morphology of boar espermatozoa. **Journal of the Royal Microscopical Society**, v. 76, p. 84-97, 1957.

HARRISON, R.A.P., VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 88, p.343-352,1990.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal**. [S.l.]: IBGE, 2019. p.1-55,

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal**. [S.l.]: IBGE, 2020.

SILVA, J. R. **Estruturas de organização dos criadores de pequenos ruminantes para o desenvolvimento de cadeias de comercialização na região de itaparica, estado de Pernambuco**. 2016. 99f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Departamento de Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016.

KAEOKET, K.; DONTA, S.; NUALNOY, P.; NOIPHINIT, J.; CHANAPIWAT, P. Effect of gamma-oryzanol enriched rice bran oil on quality of cryopreserved boar semen. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.74, p.1149-1153, 2012.

KUCUK, N.; AKSOY, M.; UCAN, U.; AHMAD, E.; NASEER, Z.; CEYLAN, A.; SERIN, I. Comparison of two 402 different cryopreservation protocols for freezing goat sêmen. **Cryobiology**, v. 68, p.327-331, 2014.

LEITE, P.A.; SCHREDERA, G.G.; ALMEIDA, C.L.R.; ZÚCCARIA, C.E.S.N. SILVA, E.V.C. Criopreservação do Sêmen Bovino. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v.13, p.279-286, 2011.

LIMA, E. B. C; SOUSA, C. N. S; MENESES, L. N; XIMENES, N. C; SANTOS JÚNIOR, M. A; VASCONCELOS, G. S; LIMA, N. B. C; PATROCÍNIO, M. C. A; MACEDO, D; VASCONCELOS, S. M. M. Cocos nucifera(L.) (Arecaceae): A phytochemical and pharmacological review. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, p. 953–964, 2015.

MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, p.327-344, 2002.

MEDINA, V.H.; VICENTE, W.R.R.; ESPER, C.R.; MALHEIROS, E.B. Uso de sondas Fluorescentes para avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides ovinos antes e após a criopreservação. **ARS Veterinária**. v.16, p.204-209, 2000

MILLER C.D. Optimizing the use of frozen-thawed equine semen. **Theriogenology**. v.70, p.463-468. 2008.

MIRANDA, Í.K. **Obtenção, caracterização e atividade antitumoral *in vitro* de bromelina de diferentes partes de abacaxizeiros**. 2014. 145f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2014.

MIRANDA, Í. K. **Obtenção, caracterização e atividade antitumoral *in vitro* de bromelina de diferentes partes de abacaxizeiros**. 2014. 165f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2014.

MOURA, M. N. C. **Estudo da atividade enzimática da bromelina pura e do resíduo de abacaxi em diferentes ph e temperatura constante**. 2010. 80f. Dissertação (Mestrado em Engenharia química) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

NASCIMENTO, J. N.; BLUME, H.; OLIVEIRA, F. J. G.; OLIVEIRA, R. A. Utilização de diferentes diluentes na criopreservação de espermatozoides de garanhões mangalarga marchador. **Ciência Animal Brasileira**, v.16, p.324-330, 2015.

NOGUEIRA, M.B.R. **Efeitos da adição *in vitro* de aminoácidos na qualidade seminal de asnos andaluzes após o descongelamento**. 2017. 94f. Tese. (Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

- OLIVEIRA, L.Z.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; CELEGHINI, E.C.C.; REEB, P.D.; MARTINS, J.P.N.; SANTOS, R.M.S.; BELETTI, M.E.; PERES, R.F.G.; MONTEIRO, F.M.; LIMA, V.F.M.H. Assessment of in vitro sperm characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine tamed-AI program. **Animal Reproduction Science**, v.137, p.145-155, 2013.
- NASCIMENTO, A. L. C.; SANTOS, A. D. F.; AZEVEDO, H. C.; ANDRADE, C. L.; OLIVEIRA, V. S. Atividade antioxidante do extrato aquoso de noni em diluente para congelamento de sêmen ovino. **Boletim de Indústria Animal**, v.73, p.68-74, 2016.
- PARIZ, J.R.; CHEMES, H.E.; MONTEIRO, R.A.C.; PIERI, P.C.; HALLAK, J. Aplicação da avaliação ultraestrutural de espermatozoides na rotina da andrologia. **Reprodução e climatologia**, v. 9, p. 37-40, 2014.
- PEÑA, A. I. Proline and glycine betaine in a diluent for freezing canine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.33, p.5-9, 1998.
- PINTO, A.C.L.; VIEIRA, M.R.; LIMA, D.L.F.; ALVES, F.A.F.; SANTOS, R.L. Água de coco em pó como suplemento hidroeletrólítico e energético para atletas. **Revista Brasileira de Medicina e Esporte**, v.21, p.12-18, 2015.
- PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 215-225, 2006.
- RAMLI, A.N.M., AZNAN, T.N.T., ILLIAS, R.M. Bromelain: from production to commercialization. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 97, p. 1386-1395, 2017.
- RIBAS-MAYNOU, J.; GARCIA-PEIRO, A.; FERNANDEZ-ENCINAS, A.; ABAD, C.; AMENGUAL, M, J.; PRADA, E.; NAVARRO, J.; BENET, J. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. **Andrology**, v.5, p.715-722, 2013.
- RIBEIRO, B. M. P. **Exames andrológicos em bovinos**. 2018. 90f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Humanidades e Tecnologias, Universidade Lusófona, Lisboa, 2018.
- SAKKAS, D., SELI; E.; MANICARDI, G. C.; NIJS, M.; OMBELET, W.; BIZZARO, D. The presence of abnormal spermatozoa in the ejaculate: did apoptosis fail? **Humam Fertility**, v.7, p. 99-103, 2004.
- SALGUEIRO, C. C. M.; NUNES, J. F. Água de coco em pó em biotécnicas da reprodução de caprinos. **Ciência animal**, v. 22, n. 1, p. 20-32, 2012.
- SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F.; OLIVEIRA, K.P.L.; VIEIRA, V.E.; GONDIM, J.M.; MATEOS-REX, E. Utilização de diluentes à base de água de coco "in natura" e em pó na inseminação artificial programada de cabras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.5, p. 96-98, 2002.

SALMAZZO, A.; FRRARI, S. Exame do sistema genital dos animais. **Revista eletrônica**, v.2, p.202-209, 2019.

SALVIANO. M.B.; SOUZA, J.A.T. Avaliação andrológica e tecnologia do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, p.159-67, 2008.

SAMPAIO, E.V.S.B. Caracterização do Bioma Caatinga: características e potencialidades. In: GARIGLIO, Maria Auxiliadora. et al. (Orgs.). **Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da Caatinga**. Brasília: Serviço Florestal Brasileiro, 2010, p.29-48.

SANTOS, T.C.; RODRIGUES, R.D.; RAO, C.; GRUNDEMANN, J.T.; BASTOS, R.P.M. Diagnóstico reprodutivo e sanitário da ovinocultura familiar na localidade garupá/uruguaiana-rs: dados preliminares. In: SALÃO INTERNACIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 7., 2016. [S.I.]. **Anais...** [S.I.]: Universidade Federal do Pampa, 2016.

SAYALI, K.; P. SADICHHA, S.; SUREKHA. Microbial esterases: an overview. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.2, p.135-146, 2013.

SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v.65, p.958-978, 2006.

SILVA, T.A.S.N. **Efeito do plasma seminal na descongelamento do sêmen ovino avaliado *in vitro* e na inseminação artificial cervical**. 2007. 64f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

SILVA, K. M. G.; GAMBOA, S. C.; RODRIGUES, A. S.; SANTOS, J. R.; GUERRA, M. M. P. Adição de piruvato de sódio e trolox ao diluidor utilizado para congelamento de sêmen de garanhões férteis e subférteis. **Ciência Rural**, v. 8, n. 38, p.2271-2277, 2008.

SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, p.370-384, 2011.

SILVA, E..F.E.; CARDOSO, T.F.; TAVARES, G.C.; COSTA, V.G.G.; SILVA, J.F.; VARELA, A.S.; LEITE, F.P.L.; CORCINI, C.D. Criopreservação de sêmen suíno e a pesquisa com antioxidantes. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.108, p.103-112, 2013.

SILVA, H. W.; FAVARIN, S. A importância econômica da criação de cabra leiteira para o desenvolvimento rural. **Revista Científica Rural**, v. 22, 2020.

SNOECK, P.P.N; HENRY, M; MELO, M.I.V. Efeito de diferentes diluidores sobre a viabilidade espermática pós descongelamento de sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.56-64, 2007.

SOUZA, W. L.; MORAES, E. A.; TONIOLLI, R. Adição de antioxidantes ao sêmen de carneiros e seus efeitos após a descongelação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, p.471-478, 2017.

TAP, F.M.; MAJID, F.A.A.; KHAIRUDIN, N.B.A. Structure prediction of Stem Bromelain from pineapples (*Ananas Comosus*) using procaricain enzyme as a modelling template. **International Journal of Applied Engineering Research**, v. 9, 6109-6111, 2016.

TONIOLLI, R.; TONIOLLO, G. H.; FRANCESCHINI, P. H.; MORATO, F. M. A. C. Uso da água de coco em pó no processo de congelação do sêmen suíno: i. Controle durante o abaixamento da temperatura entre 30 e 15°C. **Ciência Animal**, v. 24, n. 2, p. 60-72, 2014.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN K. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149–79, 2002.

VIVEIROS, A.T.M.; NASCIMENTO, A.F.; ORFÃO, L.H. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. **Theriogenology**, v.74, p.551-556. 2010.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



**GOVERNO DO ESTADO DO PIAUÍ
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ - UESPI
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**BIOPROSPECÇÃO DA BROMELINA NA QUALIDADE DO SEMEN CAPRINO (Capra hircus)**”.Protocolo número **0206/2018**, sob responsabilidade de **Antônio Luiz Martins Maia Filho**, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei número 11,794 de 08 de outubro de 2008, Decreto número 6,899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal(CONCEA), e foi DEFERIDO, pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA/UESPI) da Universidade Estadual do Piauí.

ESPÉCIE	LINHAGEM	SEXO	IDADE	PESO	VIGÊNCIA DO PROJETO	Nº DE ANIMAIS
CAPRINO	OREOCHROMIS	MACHO	15 DIAS	2,0 GRAMAS	02 ANOS	05

TERESINA, 20 DE JUNHO DE 2018


Dr. Francisco Araújo
Sub-Coordenador CEUA/UESPI
Portaria Nº 1347 - 20/11/14
CRMV - 0415/17

ANEXO B – CARTA DE SUBMISSÃO

27/10/2021 13:03

Gmail - [RSD] Agradecimento pela submissão



Antonio Maia <almmaiaf@gmail.com>

[RSD] Agradecimento pela submissão

1 mensagem

Research, Society and Development <articles@rsdjournal.org>
Para: Wcleudem Matias Nascimento <almmaiaf@gmail.com>

27 de outubro de 2021 13:02

Wcleudem Matias Nascimento,

Agradecemos a submissão do trabalho "Bioprospecção do extrato de bromelina acrescida de ACP® na qualidade do sêmen caprino" para a revista Research, Society and Development.

Acompanhe o progresso da sua submissão por meio da interface de administração do sistema, disponível em:

URL da submissão: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/authorDashboard/submission/22374>

Login: wcleuden

O custo de publicação do artigo (APC) é de R\$ 300,00 (trezentos reais) para autores brasileiros e USD 100.00 (cem dólares) para os demais autores.

As informações do custo serão enviadas após o aceite do artigo.

Entre em contato conosco também pelo WhatsApp +55 (11) 98679-6000

Equipe Research, Society and Development
rsdjournal.org

ANEXO C – ARTIGO DE ACORDO COM AS NORMAS DO PERIÓDICO RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT

Research, Society and Development, v. 10, n. 14, e578101422374, 2021
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i14.22374>

Bioprospecção do extrato de bromelina acrescida de ACP® na qualidade do sêmen caprino

Bioprospection of bromelain extract plus ACP® on buck semen quality

Bioprospección de extracto de bromelina más ACP® sobre la calidad del semen de caprine

Recebido: 27/10/2021 | Revisado: 06/11/2021 | Aceito: 09/11/2021 | Publicado: 12/11/2021

Wcleudem Matias Nascimento

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0264-2942>
Universidade Estadual do Ceará, Brasil
E-mail: wcleudemmatias@hotmail.com

Letícia Soares de Araújo Teixeira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1630-6904>
Universidade Federal do Piauí, Brasil
E-mail: leticiasoateixeira@gmail.com

Laércio Fontinele Bandeira de Macêdo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5417-3033>
Universidade Estadual do Ceará, Brasil
E-mail: laerciofbj@hotmail.com

Kenney de Paiva Porfírio

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8621-2482>
Universidade Federal do Piauí, Brasil
E-mail: kenney@ufpi.edu.br

Clarissa de Castro e Braga

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2658-9111>
Universidade Federal do Piauí, Brasil
E-mail: clah_1995@hotmail.com

Sara Camila da Silveira Costa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0381-0116>
Universidade Federal do Piauí, Brasil
E-mail: saracostapink@hotmail.com

Louis Henrique Miyauchi Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5653-2263>
Universidade Federal do Piauí, Brasil
E-mail: louisshms@hotmail.com.br

Francisca Kelly dos Santos Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8427-003X>
Universidade Federal do Piauí, Brasil
E-mail: fkelly2209@gmail.com

Elaine Nascimento Aquino

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6732-258X>
Instituto Federal de Brasília, Brasil
E-mail: lannedez@gmail.com

José Raimundo Corrêa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2752-5395>
Universidade de Brasília, Brasil
E-mail: joseraimundocorrea@gmail.com

Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3997-1694>
Universidade Federal do Piauí, Brasil
E-mail: lysbarradas@yahoo.com.br

Janaina de Fátima Saraiva Cardoso

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4484-4403>
Universidade Federal do Piauí, Brasil
E-mail: janainadefatima@hotmail.com

Cristiane Clemente de Mello Salgueiro

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0071-4030>
Universidade Estadual do Ceará, Brasil
E-mail: Cristiane.melo@uece.br

José Ferreira Nunes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1189-0937>
Universidade Estadual do Ceará, Brasil
E-mail: nunesuece@gmail.com

Fabício Pires de Moura do Amaral

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6187-2206>
 Universidade Estadual do Piauí, Brasil
 E-mail: Fabricio34amaral@gmail.com

Ney Rômulo de Oliveira Paula

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0484-3748>
 Universidade Federal do Piauí, Brasil
 E-mail: neyromulo@ufpi.edu.br

Rômulo José Vieira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4154-3808>
 Universidade Federal do Piauí, Brasil
 E-mail: rvieirasb@yahoo.com.br

Resumo

Objetivou-se avaliar o efeito do extrato de bromelina sobre a qualidade espermática, pós-descongelamento na espécie caprina. Para tanto, foram utilizados cinco caprinos da raça Anglo Nubiana, com idade reprodutiva, clinicamente saudáveis. Foram realizadas colheitas de sêmen. Após a análise da concentração, o volume total do pool foi dividido em cinco grupos. Um pertencente ao grupo controle, composto de (ACP-101/102[®]) e quatro grupos experimentais com ACP-101/102[®] enriquecidos com extrato de bromelina nas concentrações de 5%; 10%; 15% e 20%. As amostras foram criopreservadas com auxílio do aparelho Tk3000[®]. Após o período de sete dias as amostras foram descongeladas e submetidas a avaliações pelo sistema CASA. Termo resistência, sondas fluorescente, teste cometa e teste de análise ultraestrutural de espermatozoides por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Na avaliação da cinética espermática pós-descongelamento foi possível observar que os parâmetros motilidade espermática total, o grupo bromelina a 5%, se destacou dentre os demais, já na velocidade curvilínea e velocidade média da trajetória o grupo controle apresentou os melhores resultados. Quanto à integridade do DNA espermático as concentrações de bromelina (5%; 10%; 15% e 20%) não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle, demonstrando que essa substância não apresenta genotoxicidade às células espermáticas. Na análise ultraestrutural o grupo bromelina a 5% demonstrou os melhores resultados. Nesse sentido, o extrato de bromelina adicionada a meios diluentes, visando à criopreservação, caracteriza-se como uma substância promissora, sobretudo da manutenção da integridade do DNA espermático. Contudo, mais estudos são necessários para a sua padronização.

Palavras-chave: Criopreservação seminal; Bromelina; Caprino; Parâmetros espermáticos.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of bromelain extract on sperm quality after thawing in goats. For that, five Anglo Nubian goats, with reproductive age, clinically healthy, were used. Semen collections were performed. After concentration analysis, the total pool volume was divided into five groups. One belonging to the control group, composed of (ACP-101/102[®]) and four experimental groups with ACP-101/102[®] enriched with bromelain extract at 5% concentrations; 10%; 15% and 20%. The samples were cryopreserved with the aid of the Tk3000[®] device. After a period of seven days, the samples were thawed and submitted to evaluations by the CASA system, thermoresistance, fluorescent probes, comet test and ultrastructural sperm analysis test using transmission electron microscopy (TEM). In the evaluation of post-thaw sperm kinetics, it was possible to observe that the parameters of total sperm motility, the 5% bromelain group, stood out among the others, whereas in the curvilinear velocity and mean trajectory velocity the control group presented the best results. As for the integrity of sperm DNA, the concentrations of bromelain (5%, 10%, 15% and 20%) showed no significant difference in relation to the control group, demonstrating that this substance does not present genotoxicity to sperm cells. In the ultrastructural analysis, the 5% bromelain group showed the best results. In this sense, bromelain extract added to diluent media, aiming at cryopreservation, is characterized as a promising substance, especially in maintaining the integrity of sperm DNA. However, more studies are needed for its standardization.

Keywords: Seminal cryopreservation; Bromelain; Goat; Sperm parameters.

Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del extracto de bromelina sobre la calidad del esperma después de la descongelación en cabras. Para ello se utilizaron cinco cabras anglo nubias, en edad reproductiva, clínicamente sanas. Se realizaron recolecciones de semen Después del análisis de concentración, el volumen total de la piscina se dividió en cinco grupos. Uno perteneciente al grupo control, compuesto por (ACP-101 / 102[®]) y cuatro grupos experimentales con ACP-101 / 102[®] enriquecido con extracto de bromelina al 5% de concentración; 10%; 15% y 20%. Las muestras fueron criopreservadas con la ayuda del dispositivo Tk3000[®], luego de un período de siete días, las muestras fueron descongeladas y sometidas a evaluación por el sistema CASA. termoresistencia, sondas fluorescentes, prueba de cometa y prueba de análisis ultraestructural de espermatozoides mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). En la evaluación de la cinética espermática post-descongelación, se pudo observar que los parámetros de motilidad espermática total, el grupo bromelina al 5%, sobresalieron entre los demás, mientras que en la velocidad curvilínea y la velocidad media de trayectoria el grupo control presentó la Mejores resultados. En

cuanto a la integridad del ADN espermático, las concentraciones de bromelina (5%, 10%, 15% y 20%) no mostraron diferencia significativa en relación al grupo control, demostrando que esta sustancia no presenta genotoxicidad a los espermatozoides. En el análisis ultraestructural, el grupo de bromelina al 5% mostró los mejores resultados. En este sentido, el extracto de bromelina añadido a los medios diluyentes, con el objetivo de la criopreservación, se caracteriza por ser una sustancia prometedora, especialmente para mantener la integridad del ADN espermático. Sin embargo, se necesitan más estudios para su estandarización.

Palabras clave: Criopreservación seminal; Bromelina. Cabra; Parámetros de los espermatozoides.

1. Introdução

Os diluidores seminais são constituídos basicamente por substâncias energéticas, crioprotetores, soluções tampões e antibióticos. E, devido a isso, têm como função conferir proteção às células espermáticas, mantendo-as íntegras durante todo o processo de criopreservação, além de fornecer substratos necessários ao metabolismo dos espermatozoides. No entanto, apesar disso, a criopreservação seminal ainda é um desafio, pois pode gerar lesões em diferentes níveis às células espermáticas, comprometendo a sua viabilidade (Silva; Guerra, 2011).

Apesar da função protetora dos diluidores, sabe-se que a fertilidade do sêmen caprino descongelado está relacionada, fundamentalmente com a composição dos diluidores, que podem favorecer a ocorrência de alterações na distribuição e nas características dos componentes de membrana que cobrem os espermatozoides, como, por exemplo, a camada glicoproteica aderida à membrana plasmática, resultando na sua desestabilização. Esta desestabilização está relacionada ao aumento da fluidez da bicamada lipídica da membrana plasmática, o que a torna mais permeável, favorecendo a entrada de íons cálcio (livre) no interior da célula, o qual estimula o processo de capacitação espermática precocemente (Silva; Guerra, 2011).

Nesse contexto, o desenvolvimento de diluidores seminais que mantêm a viabilidade do sêmen, é de suma importância na reprodução de pequenos ruminantes, uma vez que contribui significativamente na redução de perdas durante o processo de criopreservação por crioinjúrias. E, atualmente, estudos vêm sendo desenvolvidos objetivando a adição de substâncias aos meios diluentes, a fim de proporcionar maior proteção às células espermáticas durante o processo de criopreservação de sêmen (Souza et al., 2017).

Dessa forma, diluidores alternativos a base de substratos de origem vegetal possibilita um maior controle microbiológico do produto (Bittencourt et al., 2013). E, a Bromelina (nome genérico dado ao conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nas plantas da família *Bromeliaceae*) associada à ACP – água de coco em pó constituem-se como uma boa alternativa para a formulação de meios diluentes, substituindo os substratos de origem animal (Tap et al., 2016).

A bromelina é composta por muitos aminoácidos. Além disso, é uma glicoproteína que tem um oligossacarídeo por molécula, o qual encontra-se covalentemente ligado a uma cadeia polipeptídica. Apresenta como principal resíduo aminoterminal a valina, e como resíduo carboxiterminal a glicina (Costa, 2014). E, em virtude de sua composição química, pode ser uma substância alternativa em potencial para compor os meios diluentes seminais, a fim de enriquecê-los.

Diante disso, objetivou-se, por meio deste estudo, avaliar os efeitos da bromelina associada à água de coco em pó – ACP* na qualidade espermática do sêmen caprino pós-descongelamento.

2. Material e métodos

2.1 Ética em experimentação animal

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA/UESPI) da Universidade Estadual do Piauí, sob o protocolo de número 0206/2018. Para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei número 11.794 de 08 de outubro de 2008, Decreto número 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pela Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA).

2.2 Local de realização da pesquisa

A pesquisa foi realizada no setor de Reprodução Animal do Hospital Veterinário Universitário, no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Petrônio Portela, Teresina - Piauí, Brasil. O qual fica situado à 5°03'23.1" de latitude Sul e 42°47'27.9" de longitude Oeste, com altitude média de 72,7 metros. Foram realizadas nesse setor as análises subjetivas do sêmen (turbilhamento, motilidade, vigor, morfologia, espermática e concentração espermática).

A análise computadorizada do sêmen por meio do sistema CASA foi realizada no Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino (LTSCO), inserido no Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB) da Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, Brasil, com latitude de 3°43'47" sul e longitude de 38°30'37" oeste e altitude de 16 metros acima do nível do mar.

O teste cometa para avaliação da integridade do DNA espermático foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular e de Estudos de Injúrias Biológicas – LABMINBIO no Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia e Biodiversidade – NPBio, da Universidade Estadual do Piauí (UESPI), Teresina - Piauí. E a análise espermática por microscopia eletrônica de transmissão foi realizada no Instituto de Biociências da Universidade de Brasília (UnB - DF).

2.3 Animais utilizados e grupos experimentais

Foram utilizados cinco machos da espécie caprina da raça Anglo Nubiana (P.O), oriundos da fazenda localizada no município de Campo Maior – Piauí, situada às coordenadas geográficas 4°51'35,75"S e 42°12'47,18"W. Todos em idade média de cinco anos, clinicamente saudáveis e com escore de condição corporal de 3,5, avaliados em uma escala de (0-5).

Antes do início da pesquisa os bodes foram submetidos ao exame clínico/reprodutivo de modo a verificar a higidez geral, bem como dos órgãos reprodutivos, conforme estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [CBRA], 2013). Os bodes foram manejados de forma intensiva, em baia coletiva, e a fêmea em baia individual, todos com fornecimento diário de capim elefante (*Penisetum purpureum*) picado (volumoso), concentrado proteico comercial contendo 16% PB (400g/animal/dia), sal mineral específico para caprinos e água ad libitum.

Neste estudo, foram utilizadas quatro concentrações diferentes da bromelina (5%, 10%, 15% e 20%). Essas concentrações foram testadas em 15 pools, os quais foram divididos em cinco alíquotas iguais em tubos tipo falcon de 15mL. Posteriormente, foram definidos os seguintes tratamentos experimentais (Tabela 1).

Tabela 1 – Descrição do grupo controle e grupos experimentais.

Grupo Controle	Bromelina 5%	Bromelina 10%	Bromelina 15%	Bromelina 20%
ACP® (101/102c)	ACP® (101/102c)	ACP® (101/102c)	ACP® (101/102c)	ACP® (101/102c)
2,5% gema de ovo	2,5% gema de ovo	2,5% gema de ovo	2,5% gema de ovo	2,5% gema de ovo
7% Glicerol	7% Glicerol	7% Glicerol	7% Glicerol	7% Glicerol
40mg Gentamicina	40mg Gentamicina	40mg Gentamicina	40mg Gentamicina	40mg Gentamicina
	5% Bromelina (5mg/mL)	10% Bromelina (10mg/mL)	15% Bromelina (15mg/mL)	20% Bromelina (20mg/mL)

Fonte: Autores.

2.4 Colheita e avaliação do sêmen fresco

Foram realizadas 15 (quinze) colheitas seminais de cada reprodutor caprino. Antes da colheita procedeu-se a higienização do prepúcio com solução fisiológica estéril a 0,9% e papel toalha, visando à remoção de impurezas. Os

ejaculados foram colhidos com o auxílio de uma vagina artificial específica para pequenos ruminantes, aquecida a uma temperatura de 38°C acoplada a um tubo coletor graduado tipo falcon. A fim de facilitar a colheita seminal foi utilizada uma fêmea em estro como manequim. Após cada colheita, o ejaculado foi protegido da incidência direta de luz solar, transportado ao laboratório e mantido em banho-maria à temperatura de 37°C (Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [CBRA], 2013).

Imediatamente foram realizadas as avaliações subjetivas macroscópicas (volume, cor e aspecto). Posteriormente, procederam-se as avaliações dos parâmetros espermáticos (turbilhonamento, motilidade, vigor, morfologia espermática e concentração espermática).

O turbilhonamento foi avaliado colocando-se uma gota de sêmen sobre uma lâmina previamente aquecida a 37°C, observando o movimento em forma de ondas através de um microscópio óptico (aumento de 100x). A interpretação foi expressa em uma classificação de zero a cinco, sendo que zero representa a ausência de movimento e cinco o valor máximo dado a um acentuado movimento em massa (Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [CBRA], 2013).

Foi utilizado um microscópio óptico (400x) para avaliar a motilidade espermática (escala de 0-100%) e vigor espermática (0-5), sendo depositada uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula previamente aquecidas e mantidas a 37°C. A análise morfológica foi realizada a partir da confecção de lâminas com esfregaço da amostra do sêmen dos bodes e posteriormente coradas pelo método Romanowsky (Panótico® rápido). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (400x), e posteriormente, contados 200 espermatozoides por lâmina. Para determinar a concentração espermática o sêmen foi diluído em solução formol:salina (1:200) e a contagem realizada em câmara de *Neubauer* com auxílio de um microscópio (400x) (Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [CBRA], 2013).

2.5 Diluição, processamento e criopreservação seminal

A fonte da matéria prima (bromelina) foi adquirida na empresa farmacêutica, Farmácia Equilíbrio®. Essa enzima (bromelina) foi extraída do caule do fruto do abacaxi e, em seguida, foi realizada a purificação e padronização. O Diluidor/crioprotetor (ACP®) foi adquirido na empresa ACP-Biotecnologia®. O crioprotetor Glicerol foi obtido da Sigma Aldrich Chemical Company®.

Foram adicionados dois mililitros de diluente para cada grupo experimental. Em seguida, foram envasadas em cada grupo, oito palhetas francesas de 0,25 mL (IMV Technologies, Campinas, São Paulo, Brasil) contendo 80×10^6 espermatozoides viáveis.

O processo de criopreservação foi realizado utilizando-se um congelador automatizado programável TK 3000® (TK Tecnologia em Congelação LTDA, Uberaba, Brasil), seguindo-se as instruções do fabricante, selecionando a curva rápida (0,5°C/min até 5°C; 15°C/min até -20°C e 10°C/min até -120°C). Posteriormente, as amostras foram imersas em nitrogênio líquido (-196°C) e, armazenadas em raques em botijões criogênicos (Silva et al., 2013).

Após o período mínimo de uma semana as amostras foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos. Posteriormente foram submetidas análises pós-descongelação.

2.6 Análise da cinética espermática pós-descongelação

Após o período mínimo de uma semana, as amostras foram descongeladas e submetidas à primeira análise: cinética espermática, por meio do sistema CASA (Computer-assisted Sperm Analyser), utilizando o Software Sperm Class Analyser® (SCA) (Microoptics, SL, versão 3.2.0, Barcelona, Espanha).

Para realização das análises uma amostra de 10 µL de sêmen descongelado foi diluída em 50 µL de meio ACP-101c/102c® (3,25 g; 50 mL de água destilada). Em seguida 10 µL dessas diluições foram inseridas na câmara de Makler

previamente aquecida a 37°C, e avaliadas com auxílio de microscópio de contraste de fase acoplado a uma vídeo-câmera adaptada ao sistema (Nikon™ H5505, Eclipse 50i, Japão).

Foram utilizados os parâmetros do programa: velocidade limite para espermatozoides lentos: 30µm/s; limite para velocidade média: 60µm/s; retilinearidade mínima para espermatozoides progressivos: 80%, capturados em três campos.

Os parâmetros avaliados incluíram: motilidade total (MT-%), motilidade progressiva (MP), velocidade curvilinear (VCL-µm/s), velocidade em linha reta (VSL-µm/s), velocidade média do percurso (VAP-µm/s), linearidade (LIN-%), deslocamento lateral de cabeça (ALH-µm), índice de oscilação ou wobble (WOB-%) e frequência de batimento cruzado (BCF-Hz), retilinearidade (STR-%) individual para cada célula espermática.

2.7 Análise da morfologia espermática pós-descongelamento

A análise dos defeitos espermáticos maiores e menores foi realizada utilizando-se o kit panótico rápido®. Para tanto, 10 µL de sêmen de cada amostra foi depositado sobre uma lâmina previamente identificada, seguidamente realizou-se o esfregaço. Posteriormente, as lâminas foram submetidas às três soluções de coloração celular, nessa sequência: solução 1 (fixadora), 2 (corante) e 3 (corante) (Renylab®). A avaliação morfológica foi realizada com auxílio de um microscópio óptico com aumento de 1000x, sendo contadas 200 células espermáticas em cada lâmina analisada (Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [CBRA], 2013).

2.8 Análise da integridade espermática pós-descongelamento

Imediatamente após descongelamento procedeu-se a análise da integridade da membrana acrossomal, membrana plasmática e atividade mitocondrial. A integridade da membrana plasmática foi avaliada com o uso de sondas fluorescentes, conforme descrito por Harrison; Vickers (1990) da seguinte forma: alíquotas de 50 µL de sêmen, descongeladas a 37°C por 30 segundos e acondicionadas em microtubos, foram diluídas em 150 µL de TRIS (3,786g de Tris hidroximetil aminometano; 2,0g de ácido cítrico; 1,0g de frutose; 100 mL de água destilada) contendo 5 µL de Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) (0,46 mg/mL em DMSO) e 20 µL de Iodeto de Propídio (IP; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) (0,5 mg/mL em PBS), e incubadas por 10 minutos a 37°C para posterior avaliação. Foi realizada a contagem de 100 células espermáticas em microscópio de epifluorescência (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão) no aumento de 100x, sob óleo de imersão usando filtro de emissão DBP 580- 630nm e excitação DBP 485/20nm. As células que apresentaram fluorescência verde foram consideradas íntegras, enquanto aquelas apresentando fluorescência vermelha foram consideradas danificadas.

A atividade mitocondrial foi determinada pela utilização de um fluorocromo catiônico lipofílico JC-1. Para tanto, alíquotas de 50µL de sêmen pós-descongelado foram diluídas em 150µL de TRIS contendo 5µL de JC-1 (0,15mM em DMSO) e incubadas por 10 minutos a 37°C. Um total de 200 células espermáticas foram avaliadas em microscópio de epifluorescência (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão), com aumento de 100x, sob óleo de imersão, usando-se filtro de emissão LP 515nm e BP 450 - 490nm para excitação. As células coradas em laranja foram classificadas com alto potencial de membrana mitocondrial, enquanto aquelas coradas em verde foram classificadas com baixo potencial de membrana.

2.9 Análise da integridade do DNA espermático

A análise do DNA foi realizada pelo ensaio cometa, onde as amostras de sêmen foram descongeladas e transferidas para microtubos contendo 120 mL de agarose de baixo ponto de fusão (1,5%) a 37°C. Posteriormente a mistura foi homogeneizada e transferida para lâminas pré-revestidas com 5% de agarose. Em seguida, as lâminas foram cobertas com lamínulas e colocadas a 3°C durante 20 minutos. As lamínulas foram removidas e as lâminas imersas em solução de lise por

48h. As lâminas foram colocadas numa cuba de eletroforese contendo uma solução tampão, para a desnaturação do DNA. Realizou-se a eletroforese e as lâminas foram, então, neutralizadas e, em seguida, foram secas e armazenadas para análise posterior. Finalmente, as lâminas foram coradas com GelRed® (50µl) na diluição de 1µL para 10.000µL de água destilada e cobertos com uma lamínula. As avaliações foram feitas em microscópio de imunofluorescência no aumento de 40x, em ensaio cego. Um total de 200 células espermáticas foi contado por amostra. As formas dos cometas seguiram um padrão estabelecido no laboratório. Foram utilizadas classes de 0 a 3, sendo que 0 - nenhum dano e 3 - cauda do cometa superior a duas vezes o tamanho do nucleóide. A partir destes dados calculou-se o Índice de Danos e a Frequência de Danos, variando de 0 (ausência de danos) até 100 (dano máximo).

2.10 Análise ultraestrutural das células espermáticas pós-descongelção

Para avaliação de danos na ultraestrutura das células espermáticas utilizou-se a microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para tanto as amostras do sêmen foram descongeladas a 37°C e lavadas em PBS a 37°C. Seguidamente, foram centrifugadas a 5.000 g e fixadas em glutaraldeído (2,5%) e em tampão fosfato (0,1M). Logo após, as amostras de sêmen foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio em tampão fosfato, contrastadas em bloco com acetato de uranila (2,5%), e submetidas à desidratação em séries crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) por 15 minutos em cada etapa. Ulteriormente, foram mantidas por 12 horas em mistura de acetona e resina Epon. As amostras foram transferidas para resina pura onde permaneceram por mais 12 horas. Finalmente, foram incluídas em resina Epon (Sigma, Saint Louis, MO, USA) em suporte de silicone e depositadas em estufa a 65°C para polimerização. Cortes ultrafinos em ultramicrotomo EM UC6 (Leica, Wetzlar, Germany) em corte de 70nm foram realizados. Os cortes foram coletados em grades de cobre e contrastados em acetato de uranila (5%) por 1hora e 15min e por citrato de chumbo por 4minutos, em seguida, estocados em dissecador até o momento da avaliação em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL - modelo JEM 1011, Tokyo, Japan) equipado com câmara CCD Gatan (California, USA).

2.11 Análises estatísticas

Os dados foram descritos em médias e desvios padrão. Os dados foram analisados pela ANOVA e as médias comparadas pelo teste PLSD de Fisher. Somente o vigor foi avaliado pelo teste de Kruskal Wallis. As diferenças foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$. Na correlação estatística do Ensaio Cometa para o índice de dano ao DNA espermático pós-descongelção foi utilizado o teste de Mann-Whitney. As análises da avaliação espermática por microscopia eletrônica de transmissão foram apresentadas de forma descritiva.

3. Resultados

Os dados referentes à motilidade e vigor do sêmen fresco (grupo controle) estão descritos na tabela 2. Neste estudo, pode-se observar uma redução significativa ($P < 0,05$) da motilidade e vigor nos grupos tratamentos em comparação ao grupo controle. Dentre os grupos testados, o uso de 5% de bromelina proporcionou melhor motilidade espermática após a diluição, quando comparado à concentração de 20% de bromelina.

Os parâmetros de cinética espermática do sêmen caprino criopreservado em diferentes concentrações de bromelina estão descritos nas Tabelas 3a, 3b.

Tabela 2 – Média e desvio padrão da motilidade e vigor espermático do sêmen caprino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) acrescido ou não de extrato de bromelina e avaliado após cinco minutos de incubação em banho Maria a 37 °C

GRUPOS	Sêmen caprino fresco diluído em ACP-101c	
	Motilidade (%)	Vigor (0-5)
ACP-101c (controle)	57,33 ± 22,90 ^a	3,20 ± 0,78 ^a
ACP-101c + Bromelina 5%	36,67 ± 20,59 ^b	2,07 ± 0,46 ^b
ACP-101c + Bromelina 10%	27,00 ± 20,60 ^{bc}	2,07 ± 0,46 ^b
ACP-101c + Bromelina 15%	22,00 ± 18,59 ^{bc}	2,00 ± 0,38 ^b
ACP-101c + Bromelina 20%	15,67 ± 16,13 ^c	1,73 ± 0,70 ^b

Letras diferentes entre linhas na mesma coluna indicam diferença estatística $P < 0,05$.
 Fonte: Autores.

Tabela 3a – Média e desvio padrão da cinética espermática do sêmen caprino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) acrescido ou não de extrato de bromelina pós-descongelamento.

GRUPOS	MT (%)	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)
ACP-101c (controle)	21,39 ± 15,36 ^{acd}	75,74 ± 14,14 ^a	57,90 ± 14,77 ^a	64,97 ± 15,32 ^a
ACP-101c + Bromelina 5%	33,23 ± 27,15 ^{ac}	55,46 ± 18,00 ^b	37,03 ± 16,23 ^b	45,18 ± 18,50 ^b
ACP-101c + Bromelina 10%	21,44 ± 21,42 ^{cd}	53,41 ± 16,15 ^{bc}	33,45 ± 14,69 ^b	41,94 ± 16,00 ^{bc}
ACP-101c + Bromelina 15%	14,97 ± 16,13 ^{bd}	55,90 ± 13,39 ^b	37,67 ± 15,43 ^b	47,63 ± 16,41 ^b
ACP-101c + Bromelina 20%	6,73 ± 7,66 ^b	43,42 ± 17,59 ^c	27,27 ± 16,11 ^b	33,32 ± 17,07 ^c

Letras diferentes entre linhas na mesma coluna indicam diferença estatística $P < 0,05$. MT = Motilidade total; VCL = Velocidade curvilínea; VSL = Velocidade retilínea; VAP = Velocidade média do percurso.
 Fonte: Tabela confeccionada pelos autores.

Tabela 3b – Média e desvio padrão da cinética espermática do sêmen caprino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) acrescido ou não de extrato de bromelina após descongelamento.

GRUPOS	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)
ACP-101c (controle)	73,92 ± 9,38 ^a	86,31 ± 5,02 ^a	85,49 ± 6,97 ^a
ACP-101c + Bromelina 5%	63,57 ± 12,41 ^b	79,77 ± 8,50 ^{ab}	79,12 ± 9,67 ^{ab}
ACP-101c + Bromelina 10%	60,94 ± 13,51 ^b	78,10 ± 9,32 ^b	77,28 ± 10,34 ^b
ACP-101c + Bromelina 15%	65,15 ± 14,77 ^{ab}	82,16 ± 8,07 ^{ab}	78,37 ± 12,12 ^{ab}
ACP-101c + Bromelina 20%	58,03 ± 18,28 ^b	77,11 ± 14,09 ^b	73,29 ± 14,66 ^b

Letras diferentes entre linhas na mesma coluna indicam diferença estatística $P < 0,05$. LIN: Linearidade; STR: Retilinearidade; WOB: Amplitude lateral de cabeça.
 Fonte: Autores.

Após a descongelamento, a motilidade espermática total avaliada pelo sistema CASA foi mais bem preservada no grupo controle e no grupo utilizando a concentração de 5% em comparação ao uso da maior concentração (20%).

Os parâmetros velocidade curvilínea (VCL) e velocidade média da trajetória (VAP) e velocidade linear progressiva (VSL) dos espermatozoides foram maiores no grupo controle ($P < 0,05$) em comparação aos grupos experimentais. Dentre estes, a velocidade espermática foi menor no grupo bromelina a 20%.

Neste estudo, verificou-se que a linearidade (LIN) foi maior no grupo controle quando comparado aos grupos contendo 5, 10 e 20% de bromelina. Entretanto, não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) entre as diferentes concentrações da bromelina no meio diluente sobre este parâmetro espermático.

A retilinearidade (STR) e WOB também foram significativamente superiores ($P < 0,05$) no grupo controle em comparação aos grupos experimentais de bromelina a 5%, 10%, 15% e 20%. Assim como em outros parâmetros, não foi verificada influência da concentração da bromelina.

Os dados referentes à avaliação das membranas plasmática e acrossomal, e atividade mitocondrial por meio de sondas fluorescentes estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – Média e desvio padrão dos percentuais de membrana plasmática e acrossomal íntegra e mitocôndria com potencial, de sêmen caprino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) acrescido ou não de extrato de bromelina pós-descongelamento.

GRUPOS	MEMBRANA ÍNTEGRA	MITOCÔNDRIA COM POTENCIAL	ACROSSOMA ÍNTEGRO
ACP-101c (controle)	42,80 ± 17,94 ^a	34,40 ± 22,74 ^a	43,13 ± 16,73 ^a
ACP-101c + Bromelina 5%	53,60 ± 17,39 ^{ab}	40,87 ± 20,18 ^{ab}	39,73 ± 19,54 ^{ab}
ACP-101c + Bromelina 10%	64,60 ± 19,93 ^b	53,80 ± 23,16 ^b	37,40 ± 15,72 ^{ab}
ACP-101c + Bromelina 15%	52,53 ± 23,72 ^{ab}	46,60 ± 24,91 ^{ab}	40,27 ± 15,55 ^{ab}
ACP-101c + Bromelina 20%	40,73 ± 23,31 ^{ac}	39,40 ± 22,31 ^{ab}	30,67 ± 11,91 ^b

Letras diferentes entre linhas na mesma coluna indicam diferença estatística $P < 0,05$.
 Fonte: Autores.

A membrana plasmática das células espermáticas do grupo controle apresentou melhor integridade quando comparada aos grupos com a bromelina 10% e bromelina 20% ($P < 0,05$). O potencial mitocondrial também foi superior no grupo controle em relação aos grupos experimentais - contendo 5%, 10%, 15% e 20% de bromelina. A integridade acrossomal foi superior no grupo controle em comparação aos grupos experimentais. Nestes dois últimos parâmetros, não foi observado influência da concentração de bromelina nos grupos.

Quanto à morfologia espermática os dados estão descritos na tabela 5. A ocorrência de defeitos maiores foi superior no grupo controle quando comparado aos demais. Quanto aos defeitos menores, verificou-se que não houve influência da composição do diluente na ocorrência desse tipo de alteração espermática ($P > 0,05$). A presença de defeitos totais foi significativamente menor ($P < 0,05$) no grupo contendo 20% de bromelina. A morfologia espermática foi mais bem preservada ($P < 0,05$) no grupo contendo 15% de bromelina em comparação ao grupo contendo 20% deste mesmo componente no diluente seminal, nos demais grupos não houvera diferença estatística.

Tabela 5 – Média e desvio padrão dos percentuais da morfologia espermática do sêmen caprino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) acrescido ou não de extrato de bromelina pós-descongelção.

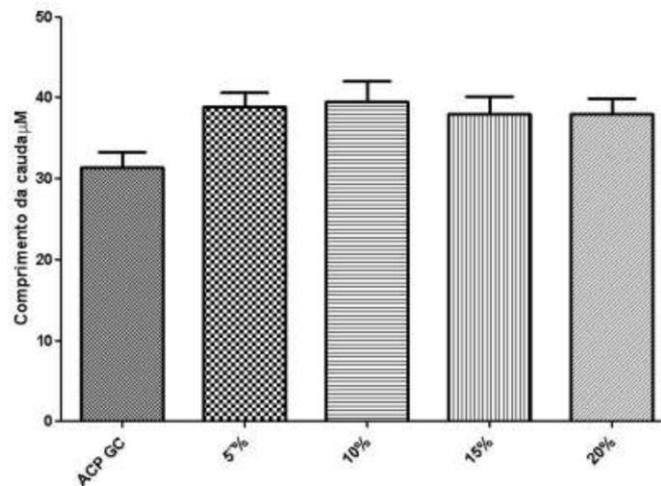
GRUPOS	DEFEITOS MAIORES	DEFEITOS MENORES	DEFEITOS TOTAIS	NORMAIS
ACP-101c (controle)	2,20 ± 1,99 ^a	3,80 ± 1,57 ^a	6,00 ± 2,56 ^a	89,20 ± 3,75 ^{ab}
ACP-101c + Bromelina 5%	0,07 ± 0,26 ^b	5,33 ± 1,96 ^a	5,40 ± 1,87 ^{ab}	89,27 ± 2,69 ^{ab}
ACP-101c + Bromelina 10%	0,20 ± 0,41 ^b	5,17 ± 1,48 ^a	5,37 ± 1,34 ^{ab}	89,00 ± 2,36 ^{ab}
ACP-101c + Bromelina 15%	0,07 ± 0,26 ^b	5,43 ± 1,15 ^a	5,50 ± 1,18 ^{ab}	91,27 ± 6,88 ^a
ACP-101c + Bromelina 20%	0,07 ± 0,26 ^b	4,30 ± 3,47 ^a	4,37 ± 3,44 ^b	88,00 ± 5,11 ^b

Letras diferentes entre linhas na mesma coluna indicam diferença estatística $P < 0,05$.

Fonte: Autores.

Os resultados referentes à integridade do DNA espermático pelo teste cometa estão descritos na Figura 1. Observou-se que não foi possível identificar diferenças significativas entre o comprimento da cauda do DNA de espermatozoides criopreservados do grupo controle e dos grupos contendo 5%, 10%, 15% e 20% de bromelina. Fato este relevante, haja vista, que o extrato de bromelina acrescido ao meio diluente, não apresentou comportamento genotóxico às células espermáticas, tornando-a uma alternativa promissora na criobiologia do sêmen caprino.

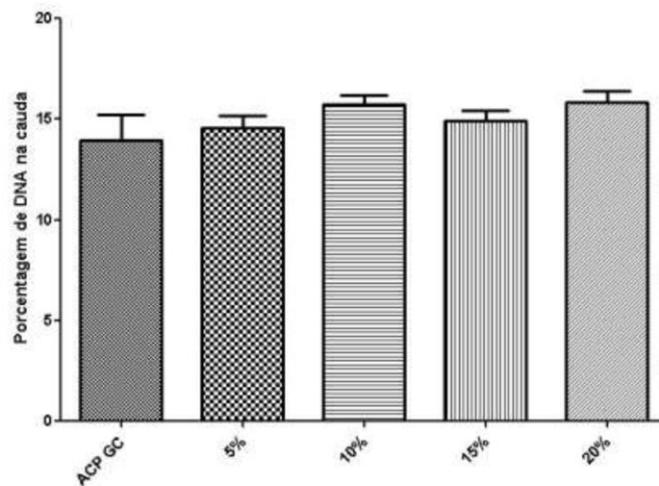
Figura 1 – Comprimento da cauda do cometa, referente à fragmentação do DNA de espermatozoides oriundos do sêmen caprino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) acrescido ou não de extrato de bromelina pós-descongelção.



Fonte: Fotografia de propriedade dos autores (2021).

Na Figura 2 é possível verificar o percentual de fragmentação de DNA no grupo controle e nos grupos experimentais (bromelina a 5%, 10%, 15% e 20%). As diferentes concentrações de bromelina não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle. Dessa forma, pode-se afirmar que a adição de bromelina em meio diluente, não compromete a cromatina de células espermáticas pós-descongelção.

Figura 2 – Percentual de fragmentação do DNA de espermatozoides oriundos do sêmen caprino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) acrescido ou não de extrato de bromelina pós-descongelamento.



Fonte: Fotografia de propriedade dos autores (2021).

Na análise ultraestrutural das células espermáticas pós-descongelamento foi possível verificar que houve alterações na ultraestrutura dessas células nos grupos experimentais (bromelina 5% e 10%), como, por exemplo, deslocamento de membrana com comprometimento de acrossoma, perda de cromatina e descontinuidade da membrana plasmática (Figura 4 e 5). As células espermáticas oriundas do grupo controle mantiveram-se íntegras quanto a sua ultraestrutura (Figura 3).

Figura 3 – Análise ultraestrutural de espermatozoides criopreservados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) sem adição de bromelina (grupo controle) através de microscopia eletrônica de transmissão.

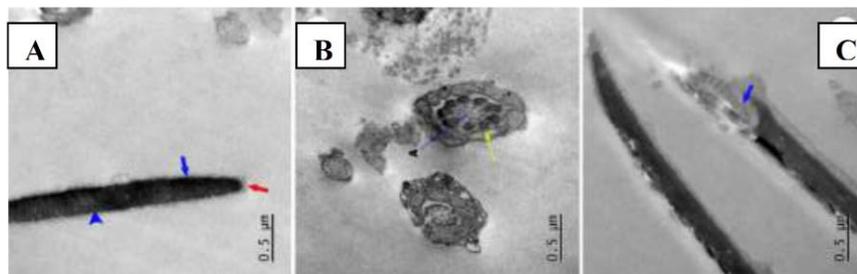


Imagem **A** = mostra região da cabeça do espermatozoide bem preservada com membrana íntegra (seta azul), cromatina com aspecto ultraestrutural típico em corte longitudinal e região do acrossoma (seta vermelha) também com aspecto ultraestrutural íntegro. Imagem **B** = mostra em corte transversal a região de transição entre peça intermediária e flagelo, colar de mitocôndrias (seta amarela) e axonema (indicado pela letra A) com aspecto ultraestrutural típico. Imagem **C** = mostra centríolo com aspecto preservado em corte longitudinal. Fonte: Fotografia de propriedade dos autores (2021).

Figura 4 – Análise ultraestrutural de espermatozóiado criopreservado em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) com adição de extrato de bromelina 5% através de microscopia eletrônica de transmissão.

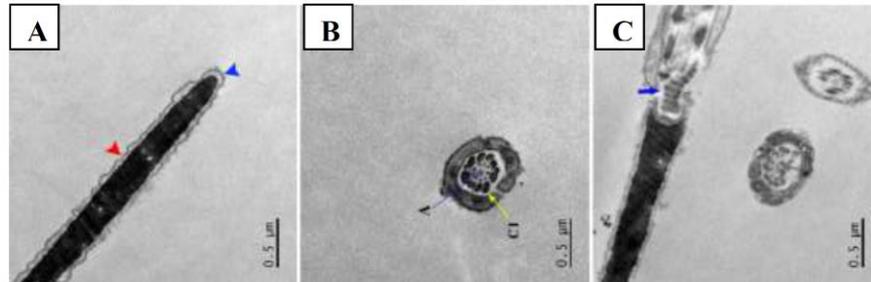


Imagem **A** = mostra descolamento da membrana (seta vermelha) da célula na região da cabeça do espermatozóiado, com comprometimento da região de acrossoma (cabeça de seta azul). Perda de cromatina representada por pontos claros eletrônicos distribuídos pela região da cabeça. Imagem **B** = mostra região de transição entre peça intermediária e flagelo, colar de mitocôndrias (indicado por CI) e axonema (indicado pela letra A) ultraestruturalmente preservados. Imagem **C** = apresenta centríolo em corte longitudinal preservado ultraestruturalmente. Esta amostra mostrou-se de preservação intermediária, apresentando células bem preservadas e células preservadas na região da peça intermediária e flagelo e pouco preservadas na região da cabeça. Fonte: Fotografia de propriedade dos autores (2021).

Figura 5 – Análise ultraestrutural de espermatozoides criopreservados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) com adição de extrato de bromelina 10% através de microscopia eletrônica de transmissão.

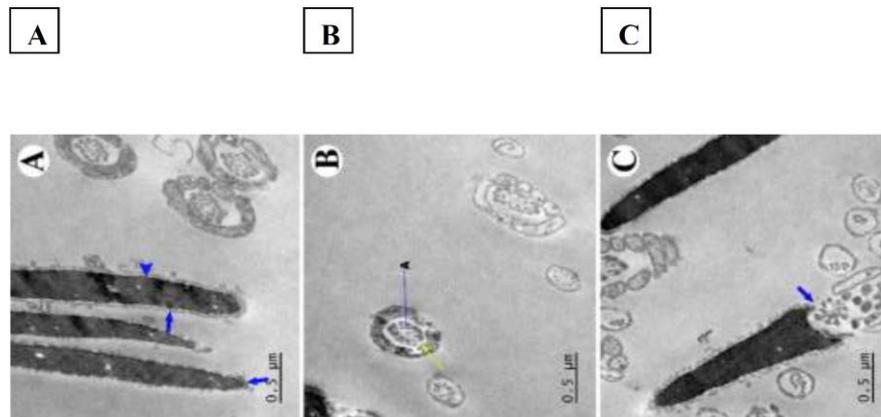


Imagem **A** = Mostra que a membrana plasmática, região do acrossoma (setas) e cromatina (eletron denso) estão conservados. No entanto, algumas células apresentam descontinuidade de membrana (cabeça de seta). Foi ainda observado diversos debris celulares no formato de anéis simples ou compostos o que indica ruptura de membrana e auto selamento em meio aquoso. A ruptura de membrana representa a inviabilidade para este tipo celular. Imagem **B** = mostra a baixa preservação das células representada pelo colar de mitocôndrias próximo ao axonema. As imagens sugerem perda de conteúdo celular, ficando apenas restos de estruturas de membrana e elementos do citoesqueleto. Seta indica parte do colar de mitocôndrias e a letra A mostra o axonema. Imagem **C** = Mostra a região dos centríolos (seta) também com aspecto desorganizado, pouco denso em descontinuidade com a cromatina. Este aspecto indica ruptura e perda de conteúdo celular. Próximo a estas células encontramos diversos debris celulares constituídos apenas de membrana com elementos internos que sugerem restos de mitocôndrias e elementos do citoesqueleto. De forma geral foi identificada nesta amostra um estado de baixa preservação celular. Fonte: Fotografia de propriedade dos autores (2021).

4. Discussão

Os parâmetros motilidade e vigor no sêmen fresco e no grupo controle foram superiores aos grupos experimentais contendo bromelina (5%, 10%, 15% e 20%). Essa variação encontrada pode ser decorrente da presença de enzimas proteolíticas no extrato de bromelina. Apesar disso, a bromelina é rica em oligossacarídeos e aminoácidos como a valina e glicina, os quais são essenciais no processo de criopreservação (Costa, 2014). As enzimas encontradas na bromelina atualmente vêm sendo muito requeridas em processos industriais e biotecnológicos, possuindo grande relevância no mercado mundial (Chapman et al., 2018).

De acordo com Nogueira (2017), uma das grandes vantagens da adição de substâncias aos crioprotetores, como, por exemplo, substâncias ricas em aminoácidos é a melhora significativa na qualidade seminal e capacidade fertilizante dos espermatozoides descongelados. Fato este que corrobora com a utilização do extrato de bromelina neste estudo.

A análise seminal computadorizada (CASA) contribuiu de forma expressiva para a compreensão dos resultados obtidos, pois de acordo com Oliveira et al. (2013) esse sistema fornece diversas informações sobre os parâmetros, como a motilidade dos espermatozoides e entre outros.

A concentração de 5% de bromelina apresentou resultados promissores para o parâmetro motilidade total (MT), apresentando resultados semelhantes aos do grupo controle. No entanto, os resultados apresentam-se abaixo do mínimo exigido para aplicação em programas de biotecnologias reprodutivas como a inseminação artificial.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que quanto maior a concentração de bromelina menor é a qualidade seminal pós-descongelamento. Essa afirmação pode ser atribuída ao poder proteolítico da bromelina, que pode gerar efeitos indesejáveis aos espermatozoides quando administrada em maiores concentrações aos diluidores seminais (Tap et al., 2016).

De acordo com Sayali et al. (2013) essas enzimas funcionam como catalizadores biológicos, que são responsáveis por realizar catalização de reações em organismos vivos. Dessa forma, por se tratar de uma enzima catalizadora a sua principal função é acelerar o metabolismo das células. Fato este que pode gerar um efeito indesejado aos espermatozoides, uma vez que o consumo de energia será grande no início (hiperativação), fazendo com que as reservas de ATP se esgotem rapidamente, levando assim a uma diminuição no seu poder de fertilização. No entanto, esse efeito não foi observado neste estudo, uma vez que os valores de VCL e VSL estão dentro da normalidade que é de até 100 $\mu\text{m/s}$. Um indicativo de hiperativação só ocorre quando esses valores se encontram acima de 250 $\mu\text{m/s}$.

A hiperativação apesar de ser benéfica e essencial é uma característica limitante, pois só deve ocorrer nas proximidades do local de fertilização (região ampolar do oviduto). Dessa forma, a ativação prematura reduz o tempo de vida útil do espermatozoide, diminuindo as chances de fecundação (Verstegen et al., 2002). Nesse sentido, é possível inferir que o efeito catalizador da bromelina não exerceu um efeito indesejável às células espermáticas.

Vale salientar que não só a adição da bromelina, em meios diluentes, contribuiu para a redução dos parâmetros espermáticos e alterações na ultraestrutura dos espermatozoides pós-descongelamento, mas também o processo de criopreservação, uma vez que crioinjúrias contribuem negativamente a ocorrência de alterações na estrutura dos espermatozoides, influenciando consequentemente nos parâmetros espermáticos.

No parâmetro velocidade média de percurso (VAP) o grupo controle apresentou resultados superiores aos grupos experimentais, no entanto, os valores encontrados neste trabalho não ultrapassaram 64,97 $\mu\text{m/s}$. a enzima catalase onde verificaram uma velocidade de 93 $\mu\text{m/s}$.

Os resultados para o parâmetro linearidade (LIN) foi significativamente superior no grupo controle quando comparado aos grupos experimentais. E de acordo com Verstegen et al. (2002) esse parâmetro tem uma correlação positiva com a taxa de prenhes. Entretanto, os valores dos grupos testados ainda apresentaram-se dentro dos padrões exigidos, não interferindo, dessa forma, em uma possível taxa de prenhes.

Para o parâmetro retilinearidade (STR) os valores encontrados no grupo controle também foram superiores aos encontrados nos grupos experimentais. Porém, os valores obtidos encontram-se dentro dos padrões esperados. Segundo Leite et al. (2011) os altos valores de retilinearidade é desejável, uma vez que demonstram que o trajeto da célula espermática é mais uniforme e com menor amplitude, sendo os resultados encontrados para esse parâmetro, neste estudo, bastante satisfatório.

No que se refere à morfologia espermática a porcentagem de espermatozoides normais em todos os grupos está dentro dos padrões estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [CBRA] (2013). Nascimento et al. (2016) relataram que o processo de criopreservação pode influenciar drasticamente nesse parâmetro, no entanto, neste trabalho, o processo de criopreservação não influenciou negativamente na morfologia dos espermatozoides.

Em relação ao potencial mitocondrial e integridade do acrossoma não foi verificada influência da concentração de bromelina nos grupos utilizando esse componente do meio de preservação seminal, porém, o grupo controle apresentou uma tendência a melhores resultados na integridade de membrana.

Neste estudo, foi observado integridade de membrana plasmática em algumas células espermáticas analisadas em microscopia de transmissão do grupo bromelina a 10%. De acordo com Nascimento et al. (2016), a adição de substâncias que levam a manutenção da integridade de membrana é extremamente importante em processos de criopreservação seminal, corroborando com o resultado encontrado nesta pesquisa.

A baixa fertilidade do sêmen descongelado é atribuída, em grande parte, a alterações nas membranas plasmáticas, acrossomais e mitocondriais, durante o processo de congelamento e descongelamento (Medina, Vicente, Esper, & Malheiros, 2000). Neste contexto, as análises através de sondas fluorescentes tornam-se essenciais para verificar se há ou não alterações que possam tornar os espermatozoides inaptos à fertilização (Lima et al., 2015).

O DNA espermático possui papel essencial na reprodução dos mamíferos domésticos (Alves et al., 2015) E o ensaio cometa é uma técnica utilizada para avaliar a fragmentação do DNA de células espermáticas, sobretudo, quando estas são submetidas a processos de criopreservação, a novos crioprotetores e novas formulações de meios diluentes (Alves et al., 2015). No entanto, mesmo apresentando resultados relevantes, essa técnica não é realizada rotineiramente. Por isso, neste estudo, o ensaio cometa foi um dos testes elencados como essenciais, para avaliação da integridade do DNA espermático.

As concentrações mais elevadas de bromelina podem ter contribuído para o aparecimento dos defeitos encontrados na ultraestrutura das células espermáticas, como, por exemplo, em nível de cabeça, peça intermediária e cauda. Segundo Pariz et al. (2014) relataram que essas lesões interferem diretamente nos parâmetros espermáticos e conseqüentemente com a capacidade de fertilidade dos espermatozoides, corroborando assim os resultados deste trabalho.

5. Conclusão

O uso do extrato de bromelina em meio diluidor/crioprotetor de sêmen caprino caracteriza-se como uma substância promissora, contribuindo significativamente para a integridade do DNA espermático. No entanto, estudos futuros são necessários para validação e determinação de novas concentrações de bromelina, bem como, a identificação de sua concentração ideal, para a efetivação de seu uso na composição de meios diluidores/crioprotetores, visando a criopreservação seminal do sêmen caprino.

Declaração de interesses conflitantes

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Financiamento

Esta pesquisa não foi financiada.

Referências

- Alves, M. B. R., Oliveira, M. L., Lançoni, R., Florez-Rodriguez, S. A., Celeghini, E. C. C., Arruda, R. P., & Andrade, A. F. C. (2015). Investigando a compactação e a fragmentação não induzida do DNA espermático: refinamento da avaliação espermática—parte. *R. bras. Reprod. Anim.*, 263-269.
- Bittencourt, R. F., Oba, E., Ribeiro Filho, A. D. L., Chalhoub, M., Azevedo, H. C., & Bicudo, S. D. (2013). Avanços na criopreservação do sêmen ovino I: diluidores e crioprotetores. *Ciência Animal Brasileira*, 14, 522-536.
- Chapman, J., Ismail, A. E., & Dinu, C. Z. (2018). Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts*, 8(6), 238.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (3a ed.). (2013). Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. CBRA.
- Costa, H. B. D. (2014). *Desenvolvimento de processo para a purificação de bromelina a partir de resíduos de abacaxizeiro (Ananas comosus var. comosus) cv. Vitória* (Doctoral dissertation, Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (RENORBIO) e Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 2014. 150p)
- Harrison, R. A. P., & Vickers, S. E. (1990). Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Reproduction*, 88(1), 343-352.
- Leite, P. A., Schredera, G. G., Almeida, C. L. R., Zúccaria, C. E. S. N., & Silva, E. V. C. (2011). Criopreservação do Sêmen Bovino, *Ciênc. Biol. Saúde.*, 13, 279-286.
- Lima, E. B. C., Sousa, C. N. S., Meneses, L. N., Ximenes, N. C., Santos, M. A., Vasconcelos, G. S., & Vasconcelos, S. M. M. (2015). Cocos nucifera (L.) (Arecaceae): A phytochemical and pharmacological review. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 48, 953-964.
- Medina, V. H., Vicente, W. R. R., Esper, C. R., & Malheiros, E. B. (2000). Uso de sondas Fluorescentes para avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides ovinos antes e após a criopreservação, *ARS Veterinária*. 16, 204-209.
- Nascimento, A. L. C., Santos, A. D. F., Azevedo, H. C., Andrade, C. L., & de Oliveira, V. S. (2016). Atividade antioxidante do extrato aquoso de noni em diluente para congelamento de sêmen ovino. Embrapa Tabuleiros Costeiros-Artigo em periódico indexado (ALICE).
- Nogueira, M. B. R. (2017). Efeitos da adição *in vitro* de aminoácidos na qualidade seminal de asnos andaluzes após o descongelamento. 94f, 2017 Tese. (Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Oliveira, L. Z., de Arruda, R. P., de Andrade, A. F. C., Celeghini, E. C. C., Reeb, P. D., Martins, J. P. N., & de Lima, V. F. M. H. (2013). Assessment of *in vitro* sperm characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine timed-AI program. *Animal reproduction science*, 137(3-4), 145-155.
- Pariz, J. R., Chemes, H. E., Monteiro, R. A. C., de Campos Pieri, P., & Hallak, J. (2014). Aplicação da avaliação ultraestrutural de espermatozoides na rotina da andrologia. *Reprodução & Climatério*, 29(1), 37-40.
- Sayali, K., Sadichha, P., & Surekha, S. (2013). Microbial esterases: an overview. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, 2(7), 135-146.
- Silva, E. F. E., Cardoso, T. F., Tavares, G. C., Costa, V. G. G., Silva, J. F., Varela, A. S., Leite, F. P. L., & Corcini, C. D. (2013). Criopreservação de sêmen suíno e a pesquisa com antioxidantes, *Rev. Port. Ciênc. Vet.* 108, 103-112.
- Silva, S. V., & Guerra, M. M. P. (2011). Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 35(4), 370-384.
- Souza, W. L., Moraes, E. A., & Tonioli, R. (2017). Adição de antioxidantes ao sêmen de carneiros e seus efeitos após a descongelamento. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37, 471-478.
- Tap, F. M., Majid, F. A. A., & Khairudin, N. B. A. (2016). Structure prediction of Stem Bromelain from pineapples (Ananas Comosus) using procaricain enzyme as a modelling template. *International Journal of Applied Engineering Research*, 11(9), 6109-6111.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., & Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57(1), 149-179.