

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: louishms@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

Fabrcio 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-descongelação 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-descongelação 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. termorresistencia, 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 los 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-descongelação.

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 (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.

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) (Microptics, 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 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.

2.7 Análise da morfologia espermática pós-descongelção

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. Ulteriormente, 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-descongelção

Imediatamente após descongelção 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-descongelamento

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 1 hora e 15min e por citrato de chumbo por 4 minutos, 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-descongelamento 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: Retilínearidade; 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.

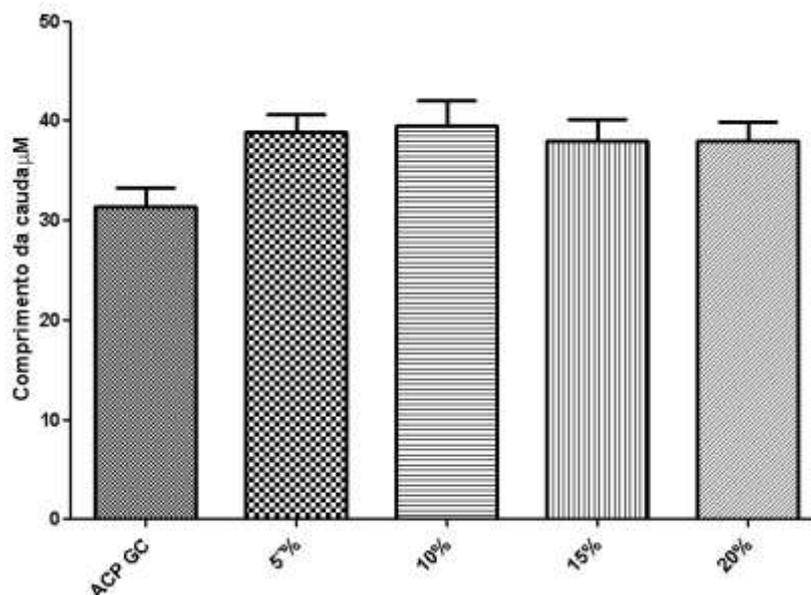
Tabela 5 – Média e desvio padrão dos percentuais da morfologia espermática do sêmen caprino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) acrescido ou não de extrato de bromelina pós-descongelamento.

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.

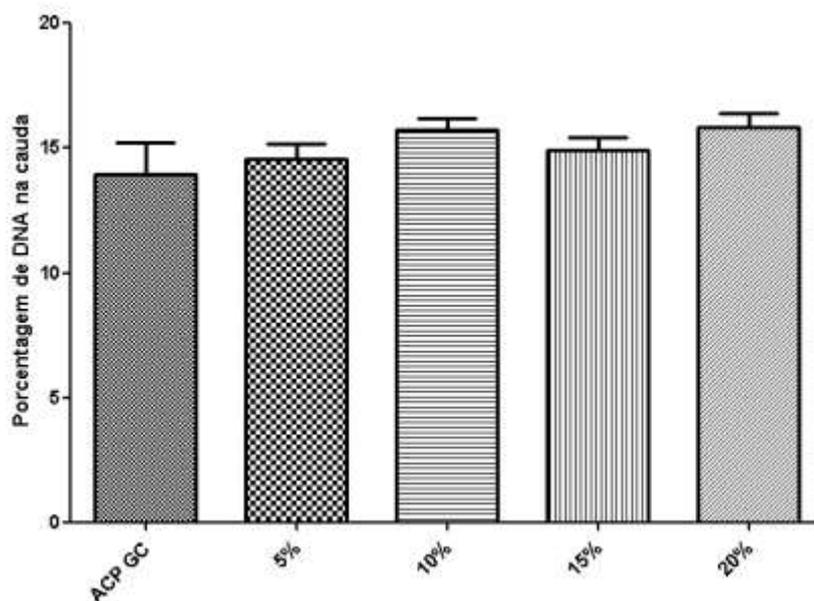
Figura 1 – Comprimento da cauda do cometa, referente à fragmentação do DNA de espermatozoides oriundos do sêmen caprino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) acrescido ou não de extrato de bromelina pós-descongelamento.



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-descongelamento.

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-descongelção.



Fonte: Fotografia de propriedade dos autores (2021).

Na análise ultraestrutural das células espermáticas pós-descongelção 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.

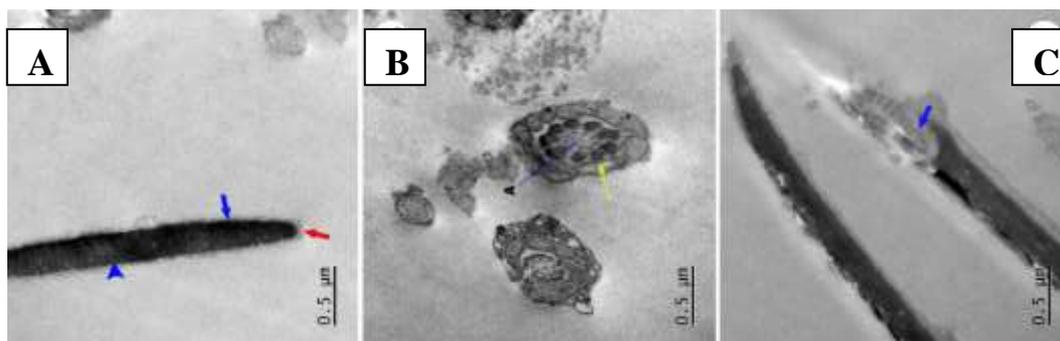


Imagem **A** = mostra região da cabeça do espermatozoide bem preservada com membrana íntegra (seta azul), cromatina com aspecto ultraestrutural típico em corte longitudinal e região do acrossoma (seta vermelha) também com aspecto ultraestrutural íntegro. Imagem **B** = mostra em corte transversal a região 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 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.

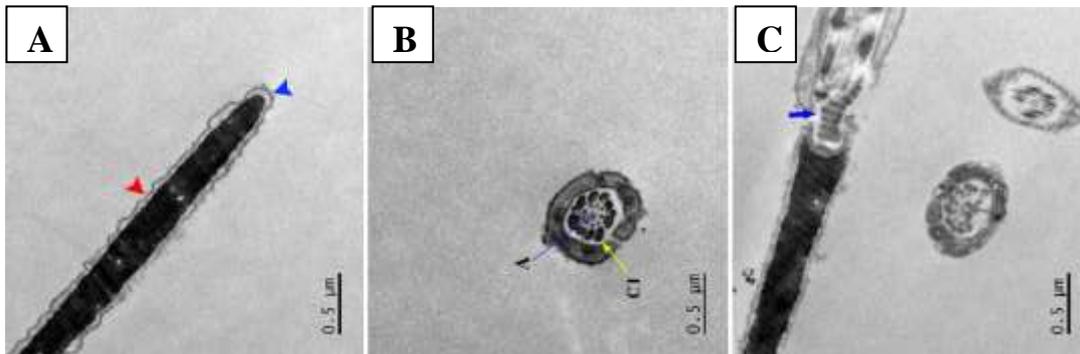


Imagem **A** = mostra descolamento da membrana (seta vermelha) da célula na região da cabeça do espermatozóide, com comprometimento da região de acrossoma (cabeça de seta azul). Perda de cromatina representada por pontos claros eletrólucidos distribuídos pela região da cabeça. Imagem **B** = mostra região 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: 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.

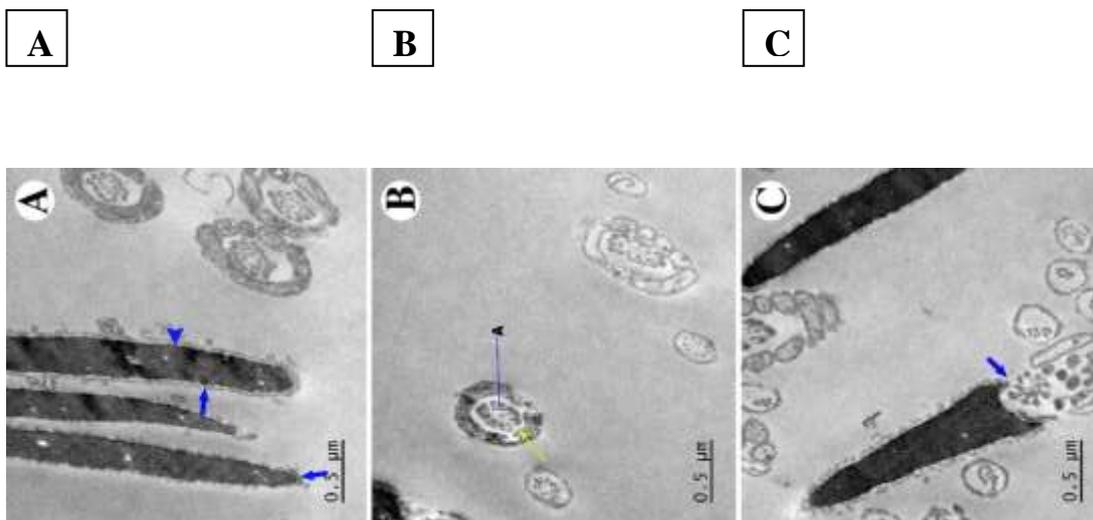


Imagem **A** = Mostra que a membrana plasmática, região do acrossoma (setas) e cromatina (eletrondenso) estão conservados. No entanto, algumas células apresentam descontinuidade de membrana (cabeça de seta). Foi ainda observado diversos debris celulares no formato de anéis simples ou compostos o que 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: 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-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. 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 congelação 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., Varella, 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 descongelação. *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.