

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**VIABILIDADE SEMINAL E *STATUS* DA CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA DE
SÊMEN OVINO REFRIGERADO EM DIFERENTES DILUENTES, DILUIÇÕES
E CONDIÇÕES DE AEROBIOSE**

MONICA ELISA BARTMER

Zootecnista/UNIPAMPA

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do grau de
mestre em Zootecnia

Área de concentração: Melhoramento e Genética Animal

Porto Alegre (RS), Brasil

Junho de 2021

MONICA ELISA BARTMER

**VIABILIDADE SEMINAL E *STATUS* DA CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA DE
SÊMEN OVINO REFRIGERADO EM DIFERENTES DILUENTES, DILUIÇÕES
E CONDIÇÕES DE AEROBIOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Bertolini

Porto Alegre

2021

“No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade”

(Albert Einstein)

Monica Elisa Bartmer
Zootecnista

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM ZOOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 30.06.21
Pela Banca Examinadora



MARCELO BERTOLINI
PPG Zootecnia/UFRGS
Orientador

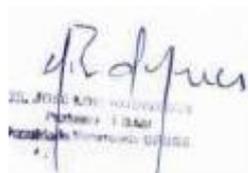


Danilo Pedro Streit Jr.
UFRGS

Homologado em: 18/08/2021
Por



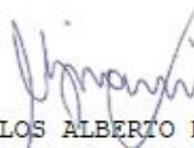
DANILO PEDRO STREIT JR.
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia



José Luiz Rigo Rodrigues
UFRGS



Elvis Ticiani
UIC



CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de Agronomia

CIP - Catalogação na Publicação

Bartmer, Monica Elisa
Viabilidade seminal e status da capacitação
espermática de sêmen ovino refrigerado em diferentes
diluentes, diluições e condições de aerobiose / Monica
Elisa Bartmer. -- 2021.
96 f.
Orientador: Marcelo Bertolini.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Capacitação Espermática. 2. CTC. 3. Reação
Acrossômica. 4. Ovinos. I. Bertolini, Marcelo, orient.
II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe Ruth por sempre estar ao meu lado, apoiando-me nos momentos mais difíceis e celebrando comigo cada vitória.

Ao Prof. Dr. Marcelo pela compreensão e pelos ensinamentos, sendo um excelente orientador permitindo que eu evoluísse como profissional e como pessoa durante o mestrado.

A cada um dos meus colegas integrantes do Laboratório de Embriologia, que me auxiliaram de alguma forma em vários sentidos nestes dois anos. Um agradecimento muitíssimo especial ao colega Eduardo, que desde o princípio demonstrou-se solícito, prestando seu auxílio e atenção em todas as ocasiões que precisei de seu apoio e suporte.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela oportunidade de cursar o mestrado, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudos.

VIABILIDADE SEMINAL E *STATUS* DA CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA DE SÊMEN OVINO REFRIGERADO EM DIFERENTES DILUENTES, DILUIÇÕES E CONDIÇÕES DE AEROBIOSE¹

Autora: Monica Elisa Bartmer

Orientador: Marcelo Bertolini

RESUMO. O objetivo deste estudo foi de determinar o *status* de capacitação espermática (CA) e de reação acrossomal (RA) durante o processamento e refrigeração do sêmen ovino sob diferentes diluentes, fatores de diluição e condições de aerobiose em função do tempo. Foram coletados ejaculados de dois carneiros adultos por vagina artificial a intervalos de 48-72 h. Após avaliações macro- e microscópicas, o sêmen foi segregado em grupos sob três diluentes (Tris-gema, citrato-gema ou leite desnatado), dois fatores de diluição (1×10^9 ou 100×10^6 células/mL) e duas condições de aerobiose (aeróbico ou semi-anaeróbico). O sêmen foi mantido refrigerado por 72 h, com avaliações a cada 24 h desde o equilíbrio a 5°C (T0). Alíquotas dos ejaculados frescos e de cada sub-grupo refrigerado de acordo com o diluente, a diluição e a aerobiose, foram coletadas nos tempos T0 e T72 para a determinação do *status* do acrossomo por coloração com clortetraciclina (CTC), e da integridade de membrana com azul de tripano e Giemsa. As maiores e menores quedas de motilidade e vigor espermáticos (M/V) em função do tempo foram observadas com a utilização de citrato-gema e Tris-gema, respectivamente. A proporção de espermatozoides com capacitação e/ou reação acrossomal aumentou após a diluição e armazenamento do sêmen ovino a 5°C, havendo correlação negativa com a viabilidade e M/V em função do tempo. Os fatores de variação sobre a M/V foram o diluente e o tempo de refrigeração, enquanto o *status* do acrossomo e a sobrevivência espermática esteve mais associada à condição de aerobiose e fator de diluição, com o diluente apresentando menor impacto no *status* do acrossomo em função do tempo.

Palavras-Chave: capacitação espermática, reação acrossômica, ovino, CTC.

¹Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Melhoramento e Genética Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (101 p.) Junho, 2021.

**SPERM CELL VIABILITY AND STATUS OF SPERM CELL CAPACITATION
OF RAM SEMEN REFRIGERATED UNDER DISTINCT EXTENDERS,
DILUTION FACTORS AND AEROBIC CONDITIONS²**

Author: Monica Elisa Bartmer

Advisor: Marcelo Bertolini

ABSTRACT. The aim of this study was to determine the status of sperm capacitation (CA) and acrosome reaction (AR) during processing and refrigeration of ovine semen under different extenders, dilution factors and aerobiosis conditions as a function of time. Ejaculates were collected from two adult rams by artificial vagina at 48-72 h intervals. After macro- and microscopic evaluations, semen was segregated into groups under three extenders (Tris-egg yolk, citrate-egg yolk or skimmed milk), two dilution factors (1×10^9 or 100×10^6 cells/mL) and two aerobiosis conditions (aerobic or semi-anaerobic). Diluted semen was kept refrigerated for 72 h, with evaluations every 24 h from the equilibrium at 5°C (T₀). Aliquots of fresh ejaculates and of each refrigerated diluted subgroup according to extender, dilution and aerobiosis were collected at times T₀ and T₇₂ for determination of acrosome status by staining with chlortetracycline (CTC), and membrane integrity with trypan blue and Giemsa. The largest and smallest falls in sperm motility and sperm vigor (M/V) as a function of time were observed with the use of citrate-yolk and Tris-yolk extenders, respectively. The proportion of capacitated and/or acrosome reacted sperm cells gradually increased over time after dilution and storage at 5°C, with a negative correlation observed with viability and M/V as a function of time. Variation factors on M/V were extender and refrigeration time, while acrosome status and sperm survival were more associated with aerobiosis condition and dilution factor, with the extender having less impact on the acrosome status as a function of time.

Keywords: sperm cell capacitation, acrosome reaction, ram, CTC.

²Master of Science dissertation in Animal Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (101 p.), June, 2021.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Características macroscópicas e microscópicas do sêmen ovino fresco, após a coleta de dois ejaculados por dia de coleta, em três dias de coleta, a partir de dois carneiros (média \pm erro padrão médio e variação)..... 55
- Tabela 2.** Média (\pm erro padrão) da proporção de alterações espermáticas identificadas em seis ejaculados de dois carneiros utilizados no experimento..... 98

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Efetivo de ovinos no Brasil (2016-2018).....21
- Figura 2.** Eventos associados ao transporte espermático e capacitação espermática na tuba uterina de mamíferos previamente à fecundação. 1: Passagem dos espermatozoides do útero à tuba uterina pela junção útero-tubárica (JUT). 2: Formação de reserva espermática no istmo pela ligação dos espermatozoides às células tubáricas. 3: Liberação de espermatozoides capacitados e hiperativados. 4: Espermatozoides capacitados e hiperativados se encontram com complexo(s) cumulus-oócito na ampola da tuba uterina, levando à reação acrossômica, penetração pela zona pelúcida e fecundação.....28
- Figura 3.** Simplificação esquemática dos principais eventos durante a capacitação espermática em mamíferos. As mudanças fisiológicas associadas à capacitação espermática são moduladas por duas vias moleculares independentes: a inibição de fosfatases serina/treonina (Ser/Thr) pela ativação de quinases da família Src, e a ativação do cAMP pelo HCO_3^- e Ca^{+2} . A ativação precoce destas vias coordena eventos subsequentes, como o aumento do pHi e a hiperpolarização da membrana, que supostamente regulam o Ca^{+2} intracelular por meio da modulação de canais iônicos específicos. O aumento do Ca^{+2} intracelular é essencial para a aquisição da motilidade hiperativada e para que os espermatozoides sofram a reação acrossômica..... 30
- Figura 4.** Sumário dos eventos regulados pela concentração de íons bicarbonato durante a capacitação espermática, o qual induz a formação de esterol e oxiesterol pela rota das espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo removidos pela albumina e pelas proteínas de ligação de oxiesterol ORP-1 ou ORP-2..... 31
- Figura 5.** Representação diagramática da maturação funcional dos espermatozoides e eventos associados.....33

- Figura 6.** Representação diagramática dos eventos físico-químicos associados ao processo de criocapacitação em espermatozoides mamíferos.....44
- Figura 7.** Tronco de coleta com fêmea manequim ovina (a), e fase pré-copulatória do ato sexual de carneiro, com operador em espera para a coleta de sêmen por vagina artificial (b).....48
- Figura 8.** Diagrama com o delineamento experimental por carneiro, denotando os dois ejaculados consecutivos obtidos por dia de coleta, seguido das avaliações macro- e microscópicas e formação do pool de ejaculados antes da diluição com três diluentes (CG, LD, TG), em dois fatores de diluição (100×10^6 , 1×10^9), e duas condições de aerobiose (A, NA) antes do resfriamento até 5°C51
- Figura 9.** Padrões de colorações epifluorescentes com fluorocromo clortetraciclina (CTC) em espermatozoides ovinos, sob iluminação de epifluorescência a 1000x.52
- Figura 10.** Diferentes categorias de classificação de espermatozoides corados com azul de tripano/Giemsa: (a) espermatozoide morto, com acrossomo lesado; (b) espermatozoide vivo, com acrossomo intacto; (c) espermatozoide morto, com acrossomo intacto; (d) espermatozoide morto, com acrossomo lesado..... 53
- Figura 11.** Efeitos do tempo de armazenamento desde a coleta sobre a motilidade (painéis da esquerda, em %) e vigor (painéis da direita, de 1 a 5) espermáticos de sêmen ovino diluído e refrigerado a 5°C por 72 h em distintos (a) diluentes, (b) diluições, e (c) condições de aerobiose..... 57
- Figura 12.** Efeitos do tempo de armazenamento na motilidade (painéis da esquerda, em %) e vigor (painéis da direita, de 1 a 5) espermáticos de sêmen ovino diluído e refrigerado a 5°C por 72 h em distintos diluentes vs. diluições (a), diluentes vs. aerobiose (b) e diluições vs. aerobiose (c)..... 58
- Figura 13.** Efeitos do diluente e diluição (a), diluente e aerobiose (b) e diluição e aerobiose (c) na motilidade (%) e vigor (1 a 5)

espermáticos de sêmen ovino diluído e refrigerado a 5°C por 72 h.....59

- Figura 14.** Efeitos do diluente (a), diluição (b), aerobiose (c) e tempo de armazenamento (d) na proporção (%) de espermatozoides não capacitados (NCA), capacitados (CA) e com reação acrossomal (RA) em sêmen ovino diluído e refrigerado a 5°C por 72 h.....60
- Figura 15.** Taxa (%) de viabilidade, capacitação espermática, e reação acrossomal de sêmen ovino fresco após a coleta (Ej) e após a diluição e refrigeração em distintos diluentes (CG, LD, TG) ao longo do tempo (T0 e T72)..... 62
- Figura 16.** Taxa (%) de espermatozoides mortos, não capacitados (NCA), capacitados (CA) e com reação acrossomal (RA) comparando duas diferentes diluições em distintos tempos de armazenamento (Ej, T0 e T72).....63
- Figura 17.** Taxa (%) de espermatozoides mortos, não capacitados (NCA), capacitados (CA) e com reação acrossomal (RA) comparando status de aerobiose em diferentes tempos de refrigeração (Ej, T0 e T72)..... 64

LISTA DE ABREVIATURAS

A – Sistema aeróbico

AMPc – Monofosfato de adenosina cíclico

AN – Sistema semi-anaeróbico

ARCO – Associação Brasileira de Criadores de Ovinos

BSP – Proteína de ligação ao espermatozóide (*Bind Sperm Protein*)

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal

CG – Citrato de Sódio-Gema-de-ovo

CTC – Clortetraciclina

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EO – Estresse oxidativo

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

FIV – Fecundação *in vitro*

GAGs – Glicosaminoglicanos

IA – Inseminação Artificial

JUT – Junção útero-tubárica

LD – Leite-em-pó Desnatado

PKA – Proteína quinase A

TALP – Solução de Tyrode com albumina, lactato e piruvato

TG – Tris-Gema-de-ovo

TRIS – Meio para criopreservação de sêmen ovino à base de tris-(hidroximetil)aminometano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 Ovinocultura, Inseminação Artificial e Problemas da Criconservação de Sêmen Ovino.....	20
2.2 Espermatozoide.....	23
2.2.1 <i>Membrana Plasmática</i>	24
2.2.2 <i>Descapacitação e capacitação espermática</i>	26
2.2.3 <i>Reação Acrossômica</i>	30
2.2.4 <i>Peroxidação Lipídica</i>	32
2.3 Plasma Seminal.....	34
2.3.1 <i>Concentração espermática e diluentes</i>	37
2.4 Métodos de avaliação da capacitação.....	40
2.5 Refrigeração	42
2.5.1 <i>Capacitação espermática induzida pela manipulação e processamento do sêmen</i>	43
2.6 Aerobiose	45
3. HIPÓTESES E OBJETIVOS	47
3.1 Hipótese	47
3.2 Objetivo Geral.....	47
3.3 Objetivos específicos.....	47
4. MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1 Local de Realização do Estudo e Animais.....	48
4.2 Coleta e Análise do Sêmen Fresco	48
4.3 Diluição e Subdivisões de Amostras.....	49
4.4 Refrigeração do sêmen	50
4.5 Determinação do <i>status</i> de Capacitação e da Integridade de Membrana.....	51
4.6 Análise estatística.....	53
5. RESULTADOS.....	55
5.1 Motilidade espermática e vigor de motilidade do sêmen ovino fresco e refrigerado ao longo do tempo após a diluição.....	56
6. DISCUSSÃO.....	65
7. CONCLUSÕES.....	71

	15
8. PERSPECTIVAS	72
9. REFERÊNCIAS	73
10. ANEXOS	95
10.1 ANEXO 1 – Coloração de Azul de Tripano e Giemsa (ATG)	95
10.2 ANEXO 2 – Coloração com clortetraciclina (CTC)	96
10.3 ANEXO 3 – Diluentes para refrigeração de sêmen ovino	97
10.4 ANEXO 4 – Espermograma	98
11. VITA	99

1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura brasileira passa por um processo de retomada de desenvolvimento que iniciou em 2013 e perdura até os dias atuais (SOUZA *et al.*, 2016). Segundo o IBGE (2019), o Brasil possui um rebanho ovino de aproximadamente 19,7 milhões de cabeças, tendo apresentado um aumento de 4,1% em relação a 2018, com o Rio Grande do Sul sendo o segundo Estado da federação em efetivo de ovinos, com cerca de 3,9 milhões de cabeças, tendo havido uma redução de 23% no Estado de 2013 a 2019 (IBGE, 2019). Não obstante, o ano de 2018 apontou para uma valorização da carne ovina e um aumento da demanda por leite ovino e seus derivados, fruto do aquecimento do mercado da gastronomia (Revista EMBRAPA, 2018). Desta forma, a busca pela maior profissionalização dos produtores e por ações que solucionem problemas crônicos na produção de ovinos, como a baixa natalidade e a baixa sobrevivência pós-natal, além de um esforço para a melhoria da qualidade genética e sanitária dos rebanhos deverão ser metas para o setor, havendo o objetivo de aumentar o rebanho no Estado para mais de 4 milhões de cabeças. No entanto, para o Rio Grande do Sul voltar a ser um grande produtor de ovinos, há a necessidade de reorganização do setor, da produção à distribuição, e de padronização dos produtos (ÁVILA *et al.*, 2013). Neste cenário promissor, as biotécnicas da reprodução voltam a se sobressair como ferramentas importantes para o melhoramento genético e para a otimização da eficiência reprodutiva do rebanho ovino gaúcho e nacional (PEREIRA *et al.*, 2017).

O Rio Grande do Sul foi pioneiro no país na utilização da inseminação artificial (IA) em ovinos, em especial no rebanho laneiro, com a instalação do primeiro posto de inseminação artificial na Estância Camoaty, em Uruguaiana, por Fernando C. Riet, em 1942 (SEVERO, 2015). Por décadas, houve a expansão do uso da tecnologia da IA, até a queda da valorização da lã e a redução significativa do rebanho ovino no Estado em meados dos anos 1980. Mesmo com a flutuação da força da cadeia produtiva de ovinos desde então, com o incremento do rebanho pelo investimento na indústria do cordeiro com raças de corte, a eficiência reprodutiva tornou-se um fator preponderante no incremento genético do rebanho ovino gaúcho (RIBEIRO *et al.*, 2002). Porém, o sêmen congelado apresenta uma redução na qualidade seminal, que dificulta a

viabilização econômica da IA, em termos de eficácia, se realizada por via cervical superficial, visto a cérvix da fêmea ovina ser longa e sinuosa, o que conjuntamente diminui as chances de concepção (BITTENCOURT *et al.*, 2013). Em tais situações, para se obter índices satisfatórios de prenhez, faz-se necessária a IA por laparoscopia (KERSHAW *et al.*, 2005) ou o desenvolvimento de métodos de transposição transcervical efetivos (AZEVEDO, 2002). A fertilidade reduzida associada à IA com sêmen congelado é atribuída aos danos aos espermatozoides causados pela crioconservação, que levam a modificações bioquímicas e funcionais na estrutura da membrana plasmática, promovendo a capacitação espermática e reação precoce do acrossomo (SALAMON; MAXWELL, 1995; STOREY; STOREY, 2017; WATSON, 1995). São observadas também a perda de motilidade, alterações na cromatina e na morfologia do espermatozoide, permeabilização significativa em conjunto com a reorganização das membranas e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), tendo um comprometimento do espermatozoide na adesão à zona pelúcida e, por fim, à reação acrossômica (RICKER *et al.*, 2006; WATSON, 2000). Atualmente uma alternativa ao sêmen congelado é o emprego do sêmen refrigerado, apesar de quando comparado com o sêmen fresco, o sêmen ovino resfriado sofre uma diminuição na motilidade e integridade morfológica, assim como um declínio na sobrevivência do trato reprodutivo feminino, redução da fertilidade e aumento da perda embrionária. Porém, tais danos são significativamente menores no sêmen resfriado do que no sêmen congelado (KULAKSIZ *et al.*, 2012; MAXWELL; SALAMON, 1993).

A IA com sêmen refrigerado, empregado em um curto período após a coleta, ganhou destaque devido a sua maior praticidade e viabilidade, quando comparada a outras formas de conservação e utilização do ejaculado (SALAMON; MAXWELL, 1995). Enquanto no congelamento e no descongelamento ocorrem danos físico-químicos aos espermatozoides, levando a uma menor qualidade e fertilidade em comparação ao sêmen diluído ou fresco resfriado (MAXWELL; WATSON, 1996), a qualidade e a viabilidade do sêmen durante o resfriamento diminuem gradualmente, à medida em que os dias de armazenamento aumentam (MAXWELL; SALAMON, 1993).

O início da capacitação dos espermatozoides se dá a partir da ejaculação, com a remoção de fatores descapacitantes e, devido a diferentes componentes

dos diluentes de sêmen. Tal processo de capacitação continua durante os procedimentos de diluição e congelamento do sêmen, promovendo alterações e danos à membrana espermática e redução potencial da fertilidade (GAO *et al.*, 1997; RICKER *et al.*, 2006). Segundo Alvarez e Storey (1993), a criopreservação do sêmen induz as membranas espermáticas a uma perda de fosfolipídios, observando-se também uma elevação no cálcio (Ca^{2+}) intracelular (KADIRVEL *et al.*, 2009), o que leva os espermatozoides criopreservados a uma maior susceptibilidade a processos precoces de capacitação, conhecidos como “criocapacitação”, reação acrossômica e perda da viabilidade celular, independentemente da espécie (OLIVARES *et al.*, 2019). Frente a isso, diluentes seminais com composições distintas são utilizados visando a proteção da membrana do espermatozoide contra os danos provocados pelo choque térmico advindo da criopreservação, além de fornecer substratos energéticos, ter efeito tamponante e diluir o ejaculado para a produção de um maior número de doses inseminantes (VERSTEGEN *et al.*, 2005).

Diferentes diluentes têm sido usados para proteger o sêmen de espécies mamíferas domésticas durante o processamento e armazenamento, tanto para o resfriamento quanto para o congelamento. Os diluentes à base de citrato de sódio e gema de ovo, Tris e gema de ovo, e leite desnatado têm sido tradicionalmente mais utilizados para o armazenamento de sêmen ovino em estado líquido (5°C), e mesmo para a crioconservação, quando da adição de glicerol como agente crioprotetor (CÂMARA *et al.*, 2018). No entanto, mesmo com os avanços das biotécnicas reprodutivas, o sêmen ovino criopreservado apresenta baixa fertilidade relacionada à estabilidade da membrana, resultado do processo de diluição, resfriamento, e/ou congelação e descongelação (ANEL *et al.*, 2006; NUNES; SALGUEIRO, 2011; SALAMON; MAXWELL, 2000; WATSON, 1995), e que pode estar relacionado ao *status* de capacitação e da reação acrossomal (RA). A criopreservação, portanto, parece predispor os espermatozoides à capacitação precoce, sendo uma das possíveis causas de baixa fertilidade na IA e na fecundação *in vitro* (FIV) quando utilizado sêmen congelado, por utilizar células espermáticas menos estáveis e que, conseqüentemente, possuem menor motilidade e vigor, e menor tempo de viabilidade que o necessário para alcançar e penetrar o oócito maturado (HAMMERSTEDT *et al.*, 1990; WATSON, 2000). Entretanto, informações sobre

o *status* do acrossomo do espermatozoide ovino após a diluição e resfriamento ainda são escassas ou incompletas. Sendo assim, este estudo visou avaliar o *status* de capacitação espermática ao longo do tempo durante o processo de preservação do sêmen ovino por resfriamento, incluindo as etapas de diluição, refrigeração e armazenamento a 5°C por até 72 h, relacionando-a à viabilidade espermática.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ovinocultura, Inseminação Artificial e Problemas da Criconservação de Sêmen Ovino

A introdução dos primeiros ovinos no Brasil se deu ao longo do século XVI para a produção de lã, com os rebanhos estando concentrados nas regiões Nordeste e Sul do país, em especial no Rio Grande do Sul (RS). No século XX, a ovinocultura atingiu seu ápice no RS, onde evoluiu e gerou grande desenvolvimento econômico (ÁVILA *et al.*, 2013; ZEN; SANTOS; MONTEIRO, 2014). Porém, o valor da lã ovina começou a se desvalorizar no final da década de 1980 devido ao aumento da produção e do estoque de tecidos sintéticos na Europa, gerando a chamada crise da lã, a qual levou à redução acentuada do rebanho ovino no Rio Grande do Sul (VIANA; SILVEIRA, 2009). Assim, o mercado posteriormente passou a focar na produção de carne, o qual se mostrou como uma nova alternativa para a ovinocultura (VIANA; SILVEIRA, 2009).

Recentemente, a ovinocultura brasileira passou por um processo de retomada de desenvolvimento que se iniciou em 2013 e continua até hoje (SOUZA *et al.*, 2016). De acordo com o IBGE (2019), o Brasil possui um rebanho ovino de cerca de 19,7 milhões de cabeças. O RS é considerado um dos maiores produtores de ovinos do Brasil (IBGE, 2019), com 3,9 milhões de cabeças. Na Figura 1 podemos visualizar as maiores concentrações de ovinos nos Estados brasileiros. Com a expansão da ovinocultura, também tivemos uma retomada no uso de biotecnologias da reprodução, como a IA e a criopreservação do sêmen, a fim de obter melhoramento genético do rebanho nacional, reduzir os riscos sanitários e otimizar a eficiência reprodutiva dos rebanhos (PEREIRA *et al.*, 2017).

A IA é uma técnica reprodutiva importante para o aumento do desempenho reprodutivo dos machos e para o melhoramento genético dos rebanhos (SMITH *et al.*, 2018). A IA com amostras fracionadas de sêmen fresco, refrigerado ou congelado, pode auxiliar no aumento rápido da descendência de reprodutores com mérito genético superior, pois permite que um maior número de fêmeas seja inseminado, em comparação aos números obtidos com a cobertura natural (O'HARA *et al.*, 2010). O melhoramento genético visa modificar geneticamente as populações de animais, com a função de aumentar a

produção, reduzindo custos, facilitando o manejo e minimizando problemas sanitários e genéticos no rebanho (GOMES *et al.*, 2013).

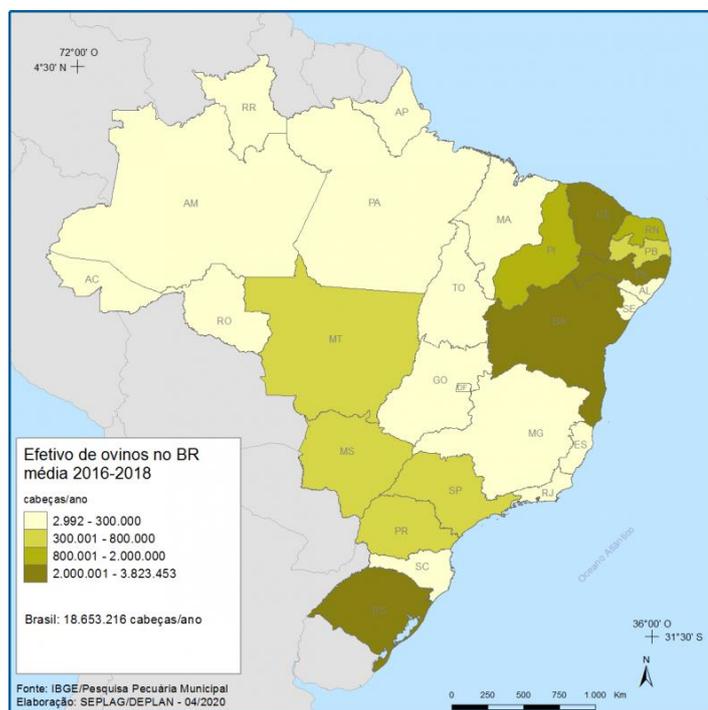


Figura 1. Efetivo de ovinos no Brasil (2016-2018). Fonte: <https://atlassocioeconomico.rs.gov.br/ovinos>. Acesso: 26/10/2020.

A baixa eficiência do congelamento do sêmen ovino tem como uma das possíveis causas as lesões de membrana e o estresse oxidativo (EO), associado ao aumento de danos induzidos pelo oxigênio e suas formas oxidantes, resultante da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que, evidências sugerem, contribuem em até 80% dos casos de dano ao espermatozoide humano (AGARWAL *et al.*, 2006; SHEKARRIZ *et al.*, 1995). Isto resulta em uma menor capacidade fecundante dos espermatozoides após a descongelação (SOUZA *et al.*, 2016). Quando temos uma produção excessiva de EROs ao ponto de exceder a capacidade antioxidante do plasma seminal, atinge-se o Estresse Oxidativo (EO). As EROs prejudicam a fertilidade espermática por duas vias principais. Primeiro, danificam a membrana do espermatozoide, o que por sua vez reduz a motilidade espermática e sua capacidade de se fundir com o óócito. Em segundo lugar, as EROs danificam diretamente o DNA do espermatozoide, comprometendo a contribuição genômica paterna para o embrião, também afetando o metabolismo energético das células (CIATTEI, 2016; TREMELLEN, 2008).

As EROs são produtos do metabolismo celular normal. A maior parte da energia do corpo de um animal é produzida pela reação enzimaticamente controlada do oxigênio com hidrogênio na fosforilação oxidativa que ocorre dentro da mitocôndria durante o metabolismo oxidativo (TREMELLEN, 2008). Durante essa redução enzimática de oxigênio para a produção de energia, os radicais livres são formados (VALKO *et al.*, 2007). Um radical livre é definido como uma molécula de oxigênio contendo um ou mais elétrons desemparelhados em orbitais atômicos ou moleculares. A adição de um elétron ao dióxigênio (O_2) forma o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que é a forma primária das EROs. Este ânion superóxido pode então ser direta ou indiretamente (enzimático, catalisado por metal) convertido em EROs secundários, como o radical hidroxila ($\cdot OH$), radical peroxila ($ROO^{\cdot-}$) ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (TREMELLEN, 2008).

No sêmen, existem duas fontes principais de produção de radicais livres, os leucócitos e os espermatozoides (TREMELLEN, 2008). A grande maioria das amostras de sêmen contém leucócitos, sendo os neutrófilos o tipo de leucócito predominante (AITKEN; BAKER, 1995; AITKEN; FISHER, 1994). Sendo a produção de EROs um dos principais mecanismos pelos quais os neutrófilos destroem os patógenos, é natural que os leucócitos seminais tenham o potencial de causar estresse oxidativo. Segundo Plante *et al.* (1994), a taxa de produção de EROs pelos leucócitos é 1000 vezes maior do que a gerada pelos espermatozoides durante a capacitação, tornando os leucócitos provavelmente o produtor principal de EROs no sêmen. Embora a produção de EROs intrínseca (produzida pelos espermatozoides) e extrínseca (produzida pelos leucócitos) esteja negativamente correlacionada com a integridade do DNA dos espermatozoides, a relação é significativamente mais forte para a produção de EROs intrínseca (HENKEL *et al.*, 2005). Isso sugere que, embora os leucócitos produzam mais EROs do que espermatozoides por célula, a proximidade entre a produção intrínseca de EROs e o DNA do espermatozoide torna a produção intrínseca de EROs uma variável mais importante em termos de potencial de fertilidade (TREMELLEN, 2008).

Para manter a fertilidade, o espermatozoide deve manter as membranas, organelas e o genoma haploide intacto. Nas etapas de processamento e conservação do sêmen, os espermatozoides podem sofrer danos no DNA, nas

membranas e nas organelas, como as mitocôndrias. Frente a isso, considerando o potencial efeito danoso da crioconservação do sêmen na geração de EO e liberação de EROs, o uso do sêmen diluído e refrigerado para a IA cervical superficial em ovinos ocupa destaque devido à maior praticidade e viabilidade quando comparada ao sêmen congelado, com menor impacto do EO do que a crioconservação (SALAMON; MAXWELL, 1995).

2.2 Espermatozoide

Os espermatozoides são produzidos nos testículos e maturados nos epidídimos. Na maioria dos mamíferos, as células espermáticas estão completamente maturadas quando atingem a cauda do epidídimo (FLESCHE; GADELLA, 2000). No epidídimo, os espermatozoides ganham potencial de motilidade e capacidade fecundante pela ação das secreções das células epiteliais e constituintes dos fluidos luminais (LAMIRANDE *et al.*, 1997).

As células espermáticas possuem cabeça e flagelo, envoltos pela membrana plasmática. A principal função da cabeça é a penetração e a liberação do material genético no oócito, e a do flagelo é de motilidade/propulsão (MORTIMER, 1997). A cabeça do espermatozoide contém volume reduzido de citoplasma, um núcleo achatado contendo cromatina altamente condensada pelo empacotamento do DNA pelas protaminas (ALBERTS *et al.*, 2015; SILVA; GADELLA, 2006), e o acrossomo (FLESCHE; GADELLA, 2000).

O acrossomo é uma vesícula secretória especializada que se localiza na parte anterior da cabeça espermática e recobre o núcleo (FLESCHE; GADELLA, 2000; GARNER; HAFEZ, 2004). O acrossomo é uma organela derivada do Complexo de Golgi e se forma no estágio inicial da espermiogênese (ZHANG; LIN, 2002). O acrossomo possui enzimas hidrolíticas na matriz acrossomal (SILVA; GADELLA, 2006), em uma variedade de proteases, fosfatases, sulfatases e esterases que são necessárias para a penetração na matriz extracelular do oócito (FLESCHE; GADELLA, 2000). O acrossomo pode ser dividido em dois segmentos, o acrossomo anterior (capa acrossomal) e o acrossomo posterior (segmento equatorial). O acrossomo também é composto pelas membranas acrossomais interna e externa. A membrana externa fica em contato com a camada interna da membrana plasmática e se funde com esta durante a reação acrossomal (RA), liberando o conteúdo acrossomal através das

vesículas que se formam por exocitose. A membrana interna fica em contato com a membrana nuclear e se mantém durante a RA juntamente com o segmento equatorial até a fusão (FLESCHE; GADELLA, 2000; ÔURA; TOSHIMORI, 1990).

2.2.1 Membrana Plasmática

A membrana plasmática, além de definir os limites da célula e manter a divisão entre os meios intra- e extracelulares, também mantém um gradiente químico de íons e outros componentes solúveis por meio de suas características semipermeáveis (ALBERTS *et al.*, 2015). A bicamada lipídica fornece a estrutura básica da membrana e serve como barreira quase impermeável à passagem da maioria das moléculas solúveis em água (ALBERTS *et al.*, 2015). Dentre as diferentes espécies mamíferas, a composição lipídica da membrana plasmática pode variar consideravelmente, mas em geral contém cerca de 70% de fosfolipídios, 25% de lipídios neutros e 5% de glicolipídios (FLESCHE; GADELLA, 2000; MANN; LUTWAK-MANN, 2012).

Uma das características essenciais da membrana é a sua fluidez, e, para mantê-la e permitir que os processos biológicos de transporte e atividades enzimáticas ocorram, a composição da membrana e a temperatura são essenciais, podendo cessar as atividades se a viscosidade da bicamada lipídica for aumentada (ALBERTS *et al.*, 2015; HAMMERSTED *et al.*, 1990). Os fosfolipídios da membrana plasmática têm uma disposição assimétrica nos dois folhetos da bicamada (HARRISON; GADELLA, 1995), com lipídios com carga neutra ou positiva, como a esfingomielina e a fosfatidilcolina, assim como os glicoesfingolipídios, residindo preferencialmente no folheto externo e os fosfolipídios aniônicos, como fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidilinositol preferindo o folheto interno, sendo que apenas a fosfatidilserina possui carga negativa (ALBERTS *et al.*, 2015; PARKS; LYNCH, 1992). Diferenças no comprimento da cadeia de ácidos graxos, interações com colesterol e acoplamento de proteínas (para formar canais transmembrana ou complexos receptor-ligante) também afetam as interações dos dois folhetos (PARKS; LYNCH, 1992). Durante a ejaculação, os espermatozoides se misturam com as proteínas do plasma e essas proteínas removem algum (5-8%) colesterol (o primeiro efluxo de colesterol) da membrana plasmática. Normalmente, o colesterol se liga aos colinofosfolipídios, impedindo a livre movimentação de

fosfolípidios e estabilizando a membrana (VILLEMURE *et al.*, 2003). Diversas proteínas ligam-se especificamente aos grupos fosforilcolina, e algumas exibem uma especificidade de ligação muito mais ampla para fosfolípidios de colina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico e cardiolipina (DESNOYERS; MANJUNATH, 1992). As proteínas do plasma seminal se ligam à superfície do espermatozoide junto ao acrossomo, ao pós-acrossomo e à região da peça intermediária após a ejaculação, importantes para iniciar a motilidade (MANJUNATH *et al.*, 1994). Devido à metilação da fosfatidiletanolamina durante a capacitação, os níveis da fosfatidilcolina podem aumentar na membrana (FLESCHE; GADELLA, 2000; SELIVONCHICK *et al.*, 1980).

A quantidade de lipídios neutros (colesterol) da membrana é o fator de maior variação entre as diferentes espécies, indivíduos da mesma espécie e ejaculados do mesmo indivíduo (FLESCHE; GADELLA, 2000), estando diretamente relacionado à taxa de capacitação espermática, já que, como demonstrado por Flesch e Gadella (2000), o colesterol deve ser retirado da membrana plasmática espermática durante o processo de capacitação. O colesterol é um lipídio que estabiliza a bicamada lipídica, estando alojado entre as moléculas de fosfolípidios, diminuindo a mobilidade, e por conseguinte, a fluidez da membrana. Nos ovinos, a taxa de colesterol:fosfolípidios é muito baixa (0,38) sendo consideravelmente menor que em outras espécies (EVANS; MAXWELL, 1987; PARKS; HAMMERSTEDT, 1985), incluindo a humana (0,99) (DARIN-BENNETT; WHITE, 1977; GRASA *et al.*, 2006). Reduções no teor de colesterol podem causar comprometimento na integridade da membrana (COLAS *et al.*, 2008).

A refrigeração do sêmen expõe os espermatozoides a uma redução gradual de temperatura e de metabolismo, com a membrana plasmática apresentando uma transição de fase lipídica em resposta ao estresse (HOLT, 2000). Em ovinos, essa transição ocorre tipicamente entre 17 e 28°C, em suínos entre 18 e 24°C, e em caprinos, ao redor de 21°C (PARKS; LYNCH, 1992). Durante esta transição, ocorre uma reorganização das cadeias hidrocarbonadas, passando do estado fluido e desordenado para o estado de gel, e uma organização mais acentuada que torna a membrana mais suscetível à ruptura (DROBNIS *et al.*, 1993). Como demonstrado por ROȘCA *et al.* (2020), a redução

da relação proteína/lipídio durante o descongelamento aparenta ser mais vantajosa na preservação funcional das células do que seu aumento, já que o sêmen bovino e de carpa, que apresentam as membranas com maiores reduções, também apresentam melhores resultados reprodutivos após a criopreservação do que o sêmen ovino, suíno e do galo.

2.2.2 Descapacitação e capacitação espermática

Durante a passagem do espermatozoide pelo epidídimo, a membrana plasmática sofre diversas mudanças bioquímicas. Além da maturação epididimária, os espermatozoides também passam por modificações bioquímicas e funcionais no trato reprodutor da fêmea conhecidas como capacitação espermática (TULSIANI *et al.*, 1997).

O fenômeno da capacitação espermática foi observado pela primeira vez por dois pesquisadores, Chang e Austin, de forma independente (AUSTIN, 1951; CHANG, 1951). Os autores descobriram que os espermatozoides mamíferos necessitam permanecer no trato feminino por um período antes de adquirir a capacidade de fecundar. A capacitação espermática é um processo que envolve uma série de eventos simultâneos, como a remoção do plasma seminal e colesterol da membrana plasmática, desestabilizando e aumentando a fluidez da membrana espermática e permitindo o transporte de íons (cálcio e bicarbonato), com o aumento de seus níveis intracelulares (LEEMANS *et al.*, 2019; VISCONTI *et al.*, 2011), assim como do pH intracelular (MEDEIROS *et al.*, 2002). Sinalizações intracitoplasmáticas ocorrem via segundo mensageiros, com mudanças na localização, estrutura molecular e na mobilidade das proteínas da membrana. Há a produção de EROs e a exteriorização de receptores específicos, com alterações na atividade e nos padrões de fosforilação da proteína quinase A (PKA) que levam ao aumento na concentração de monofosfato de adenosina cíclico, ou AMPc (ARCELAY *et al.*, 2008; KRAPP *et al.*, 2010; LEEMANS *et al.*, 2019; MEDEIROS *et al.*, 2002; YANAGIMACHI, 1981).

A capacitação espermática *per se* inicia na região do istmo da tuba uterina e precede a reação do acrossomo (HAFEZ; HAFEZ, 2016). A tuba uterina da fêmea disponibiliza um microambiente adequado para o transporte, armazenamento, capacitação dos espermatozoides, fecundação e cultivo

embrionário (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007). Após a ejaculação, tanto no trato genital feminino ou mesmo *in vitro*, as células espermáticas iniciam a fase final da maturação chamada de capacitação espermática (BUFFONE, 2016). Tal processo inicia durante o transporte espermático, pela separação das células espermáticas do plasma seminal, o qual contém componentes ou fatores descapacitantes, sem que ocorram modificações morfológicas e bioquímicas na célula. Uma vez na tuba uterina, ocorrem modificações bioquímicas na membrana plasmática que resultam em desestabilização pelo aumento da fluidez e em hiperativação, processos essenciais na fecundação, para que ocorra a reação acrossômica e a penetração do espermatozoide no oócito (Figura 2). O fluido da tuba da fêmea apresenta glicosaminoglicanos (GAGs) não sulfatados e/ou sulfatados (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007), os quais se revelaram importantes moléculas na capacitação espermática. Dentre os GAGs, a heparina e o sulfato de heparano são os mais importantes. Para um entendimento melhor da atuação da heparina, Parrish (2014) sugeriu que esta atua se ligando a proteínas do plasma seminal, conhecidas como BSPs (*Binder of Sperm Proteins*), que cobrem a superfície espermática durante a ejaculação, com função descapacitante. Estas proteínas tendem a interagir com o colesterol e fosfolipídios da membrana plasmática dos espermatozoides. Ao se ligarem com a heparina, há uma perda das BSPs com a ligação com lectinas espermáticas, iniciando a perda de componentes de superfície do espermatozoide, levando à desestabilização da membrana (MAHMOUD; PARRISH, 1996; MEDEIROS; PARRISH, 1996). Assim, mudanças nos componentes de superfície provavelmente estão relacionadas à perda de BSPs induzidas pela heparina ao longo do tempo que conduzem a uma perda de colesterol e fosfolipídios de membrana (MANJUNATH; THÉRIEN, 2002). Com isso ocorre uma desestabilização da membrana, além de mudanças no pH intracelular, e nos níveis de AMPc e Ca^{2+} intracelular (Ca_i^{2+}).

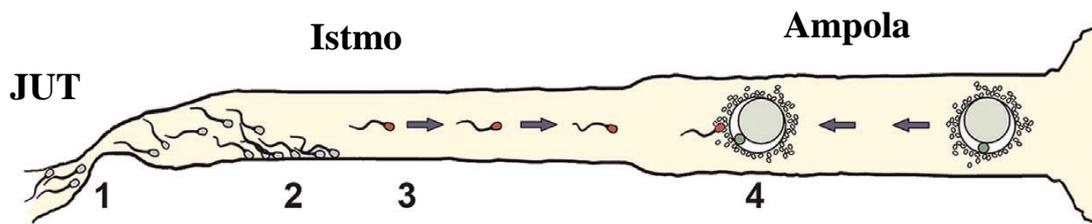


Figura 2. Eventos associados ao transporte espermático e capacitação espermática na tuba uterina de mamíferos previamente à fecundação. 1: Passagem dos espermatozoides do útero à tuba uterina pela junção útero-tubárica (JUT). 2: Formação de reserva espermática no istmo pela ligação dos espermatozoides às células tubáricas. 3: Liberação de espermatozoides capacitados e hiperativados. 4: Espermatozoides capacitados e hiperativados se encontram com complexo(s) *cumulus*-oócito na ampola da tuba uterina, levando à reação acrossômica, penetração pela zona pelúcida e fecundação. Fonte: Gervasi & Visconti (2016), modificado de Coy *et al.* (2012).

Uma vez o plasma seminal removido, a membrana espermática passa a apresentar maior fluidez e ativação de canais iônicos (OKAMURA *et al.*, 1991), o que leva ao aumento na concentração intracelular de HCO_3^- e Ca^{2+} (HOSHI *et al.*, 1990; BENOFF, 1993), assim como a ativação de cascatas de sinalizações intracelulares por segundo mensageiros, incluindo o cAMP via adenilato ciclase solúvel no citoplasma e o aumento intracelular de Ca^{2+} via fosfolipase C (suínos: FLESCHE; GADELLA 2000; GADELLA *et al.*, 2008; equinos: RATHI *et al.*, 2003). Como demonstrado em suínos (BOERKE *et al.*, 2008) e humanos (BROMFIELD *et al.*, 2016) o HCO_3^- induz a formação de microdomínios lipídicos, conhecidos como “agregação de jangadas lipídicas” (*aggregation of lipid rafts*) na superfície do espermatozoide, os quais são essenciais para permitir o efluxo de colesterol, aumentando ainda mais a fluidez da membrana plasmática (SIMONS; TOOMRE, 2000; VAN GESTEL *et al.*, 2005). A ativação da isoforma solúvel da adenilato ciclase e a produção concomitante de AMPc tem como resultado uma maior depleção de colesterol da membrana espermática através de aceptores de colesterol, como a albumina (> 1 h), que é seguida por uma série mais lenta de alterações de membrana com a agregação dos microdomínios ordenados de lipídios na crista apical da cabeça do espermatozoide, em menos de 1 h (VAN GESTEL *et al.*, 2005).

Uma das primeiras etapas da capacitação é a remoção de colesterol da membrana plasmática, com esta perda podendo ser realizada pela oxidação de esteróis de membrana, em processo de lipoperoxidação mediada por EROs (BOERKE *et al.*, 2013), ou por transportadores/aceptores de colesterol ativos

que transferem colesterol livre para a porção hidrofóbica da molécula de albumina (FLESCH *et al.*, 2001). O efluxo de colesterol induz a reorganização lipídica da membrana, o que aumenta a permeabilidade ao Ca^{2+} , HCO_3^- e K^+ . As EROs nem sempre são associadas a processos deletérios de oxidação patológica de moléculas biológicas, como os lipídios. A produção fisiológica de EROs que ocorre durante a capacitação do espermatozoide foi demonstrada pela primeira vez em 1993, indicando que a capacitação do espermatozoide pode ser considerada um processo oxidativo dependente da geração ativa de EROs (LAMIRANDE; GAGNON, 1993). Este processo também pode ainda auxiliar na regulação da fosforilação da tirosina quinase, outro marcador de capacitação importante, aumentando a produção de cAMP (AITKEN *et al.*, 2004, AITKEN, 2011) e suprimindo a atividade da tirosina fosfatase (TAKAKURA *et al.*, 1999).

O tempo de capacitação espermática varia dependendo da espécie animal. Por exemplo, espermatozoides ovinos e suínos possuem uma menor quantidade de colesterol quando comparados com humanos e bovinos, exigindo apenas uma ou duas horas para a capacitação, diferentemente dos bovinos, que requerem cerca de seis horas, e humanos, que necessitam de oito horas. O período é necessário para que a taxa de efluxo de colesterol da membrana plasmática chegue ao nível necessário para desencadear a cascata de eventos da capacitação espermática (FLESCH; GADELLA, 2000; YANAGIMACHI, 1994).

O íon bicarbonato é considerado um dos principais desencadeadores da capacitação espermática (Figuras 3 e 4), induzindo diretamente uma adenilato ciclase espermática específica que atua na ativação da PKA via cAMP, que, por fosforilação da tirosina, ativa direta ou indiretamente o deslocamento de fosfolipídios, levando a um aumento da fluidez da membrana (LUCONI *et al.*, 2005). Na cauda do epidídimo a concentração de íon bicarbonato é baixa (menor que 1 mM); já no trato genital feminino, a concentração deste íon é de aproximadamente 15 mM; tal diferença possui papel importante em impedir a capacitação no trato masculino, pois a sua ausência inibe a fosforilação da tirosina. Por outro lado, a maior concentração do íon bicarbonato no trato feminino estimula a capacitação espermática (VISCANTI; KOPF, 1998).

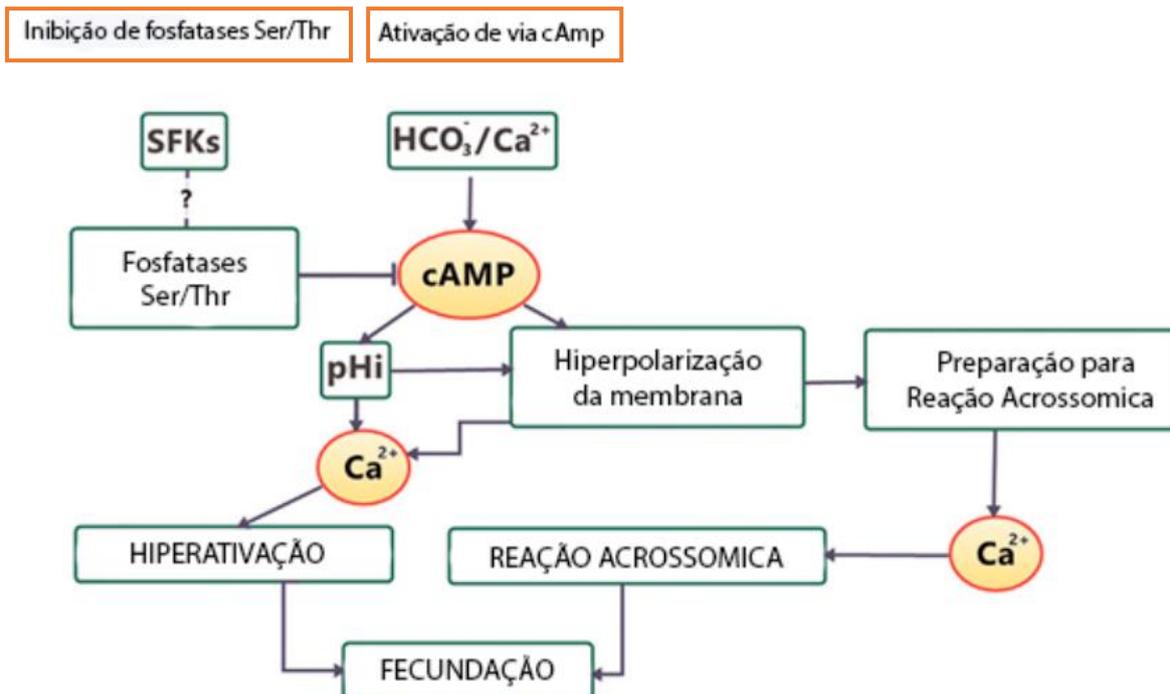


Figura 3. Simplificação esquemática dos principais eventos durante a capacitação espermática em mamíferos. As mudanças fisiológicas associadas à capacitação espermática são moduladas por duas vias moleculares independentes: a inibição de fosfatases serina/treonina (Ser/Thr) pela ativação de quinases da família Src, e a ativação do cAMP pelo HCO_3^- e Ca^{2+} . A ativação precoce destas vias coordena eventos subsequentes, como o aumento do pHi e a hiperpolarização da membrana, que supostamente regulam o Ca^{2+} intracelular por meio da modulação de canais iônicos específicos. O aumento do Ca^{2+} intracelular é essencial para a aquisição da motilidade hiperativada e para que os espermatozoides sofram a reação acrossômica. Fonte: modificado de Gervasi e Visconti (2016).

2.2.3 Reação Acrossômica

Somente após a reação acrossomal o espermatozoide estará apto a atravessar a zona pelúcida para se ligar à membrana plasmática do oócito. A reação acrossomal se inicia com a ligação do espermatozoide à zona pelúcida, o que resulta em intensificação da desestabilização da membrana, que culmina com a fusão da membrana plasmática e da membrana acrossomal externa, e com a exocitose do conteúdo acrossomal, com a liberação e ativação de enzimas hidrolíticas e proteolíticas, principalmente acrosina e hialuronidase (GADELLA, 2008; YANAGIMACHI, 1994). Com a reação acrossomal temos modificações de algumas proteínas da membrana espermática que são translocadas ao segmento equatorial e pós-equatorial em um nível necessário para permitir a posterior fusão com a membrana oocitária (PATRAT *et al.*, 2000). A reação é um processo que, após iniciada, não pode ser revertida ou interrompida (LAMIRANDE *et al.*, 1997).

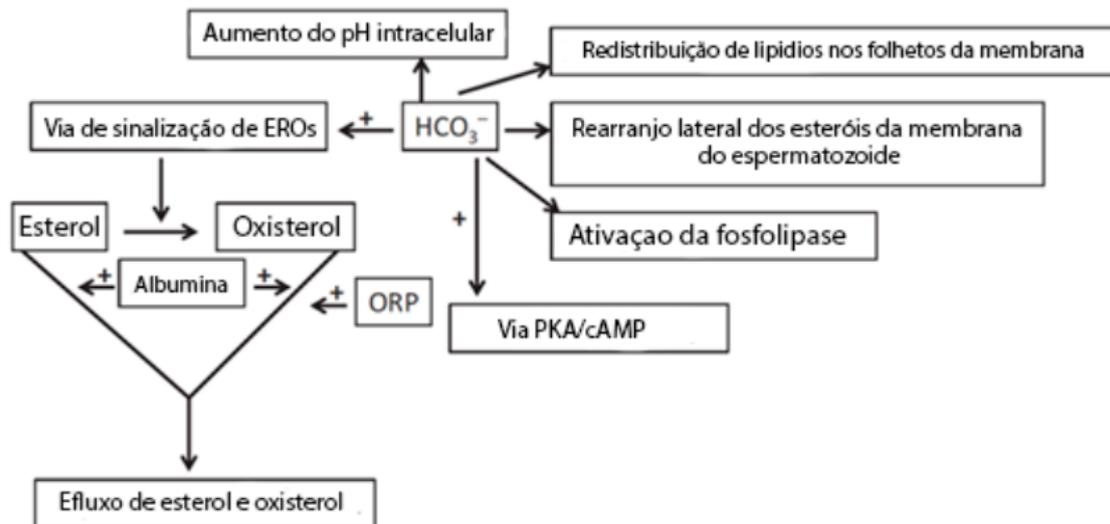


Figura 4. Sumário dos eventos regulados pela concentração de íons bicarbonato durante a capacitação espermática, o qual induz a formação de esterol e oxisterol pela rota das espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo removidos pela albumina e pelas proteínas de ligação de oxisterol ORP-1 ou ORP-2. O bicarbonato também participa na remodelação da membrana, na alcalinização intracelular e na ativação da rota PKA/AMPc. Fonte: modificado de Gangwar & Atreja (2015).

In vivo, a zona pelúcida é o principal indutor fisiológico da reação acrossomal através da glicoproteína ZP3, que atua como ligante para um ou mais receptores da membrana plasmática do espermatozoide (WASSARMAN, 1999). Porém, também existem evidências de que a progesterona secretada pelas células do *cumulus* e presente no líquido folicular seja um co-fator importante da RA ao auxiliarem na indução do influxo de Ca^{2+} (OSMAN *et al.*, 1989).

Com a reação acrossomal, diversos processos podem ocorrer, como o influxo de íons cálcio, a geração de espécies reativas ao oxigênio (EROs), o aumento da atividade da adenilato ciclase e a fosforilação de proteínas (AITKEN; BAKER, 1995). Durante a capacitação temos um aumento constante no nível de íon cálcio intracelular até ocorrer a reação do acrossomo. Neste momento, há mais um influxo de íons cálcio e a fusão da membrana acrossomal externa com a membrana plasmática (GADELLA *et al.*, 2001; PATRAT *et al.*, 2000), quando as enzimas acrossomais são liberadas (ANDRADE, 2009).

2.2.4 Peroxidação Lipídica

Mesmo que a produção de EROs seja fisiologicamente necessária à função espermática, conforme já mencionado acima, estudos têm demonstrado que os espermatozoides são susceptíveis a danos causados quando há elevada produção de EROs, o que pode interferir nas funções e na integridade das estruturas espermáticas (GUERRA *et al.*, 2004). A produção de EROs ocorre em sistemas aeróbicos, ou parcialmente aeróbicos. O plasma seminal possui enzimas e algumas moléculas que atuam como antioxidantes, protegendo os espermatozoides de concentrações excessivas de EROs, as mais comuns sendo a catalase (JEULIN *et al.*, 1989), as vitaminas A, C (NIKI, 1983) e E (CHOW, 1991), a glutathione (KIDD, 1997), a espermina, tióis, e uratos (GAVELLA *et al.*, 1997), a albumina, a taurina e a hipotaurina (ALVAREZ; STOREY, 1993), a L-carnitina e o zinco (RAPHAEL, 2007; SAALU, 2010). Porém, há um aumento acentuado na produção de EROs após a retirada drástica do plasma seminal ou quando na presença de muitas células inflamatórias e espermatozoides defeituosos no ejaculado, o que compromete o efeito antioxidante e aumenta potencialmente os danos às células (AITKEN *et al.*, 2004; RAPHAEL, 2007).

Em baixas concentrações, as EROs participam de processos vitais dos espermatozoides como maturação, capacitação e hiperativação espermáticas, além de atuar na reação acrossomal, na ligação com a zona pelúcida e na fusão com o oócito (BROUWERS; GADELLA, 2003; KOTHARI *et al.*, 2010). As EROs presentes em concentrações elevadas causam estresse oxidativo, pois os espermatozoides mamíferos são altamente sensíveis aos efeitos da peroxidação lipídica por possuírem um alto teor de lipídeos poli-insaturados na membrana plasmática, mais suscetíveis às EROs, o que leva também a disfunções como a inibição do metabolismo e da motilidade espermática (GUERRA *et al.*, 2004; SANOCKA; KURPISZ, 2004). O alto nível de EROs no sêmen está associado ao declínio da qualidade espermática e à fragmentação do DNA em bovinos (FERNÁNDEZ-SANTOS *et al.*, 2008), humanos (COCUZZA *et al.*, 2007) e ovinos (MATA-CAMPUZANO *et al.*, 2012).

A peroxidação lipídica causa alterações na estrutura da membrana plasmática, levando à perda de fluidez e da capacidade de regulação dos íons intracelulares que atuam no controle da motilidade espermática, em mudanças no metabolismo e na perda da capacidade de fecundação (AITKEN; KRAUSZ,

2001; BUI *et al.*, 2018). Entretanto, apesar dos efeitos prejudiciais, a produção de EROs faz parte do metabolismo espermático, já que em baixos níveis, é necessária a produção como pré-requisito para a capacitação, além de atuar na ligação com a zona pelúcida (BROUWERS; GADELLA, 2003), entre outros eventos, conforme já discutido acima, e sumarizados na Figura 5.

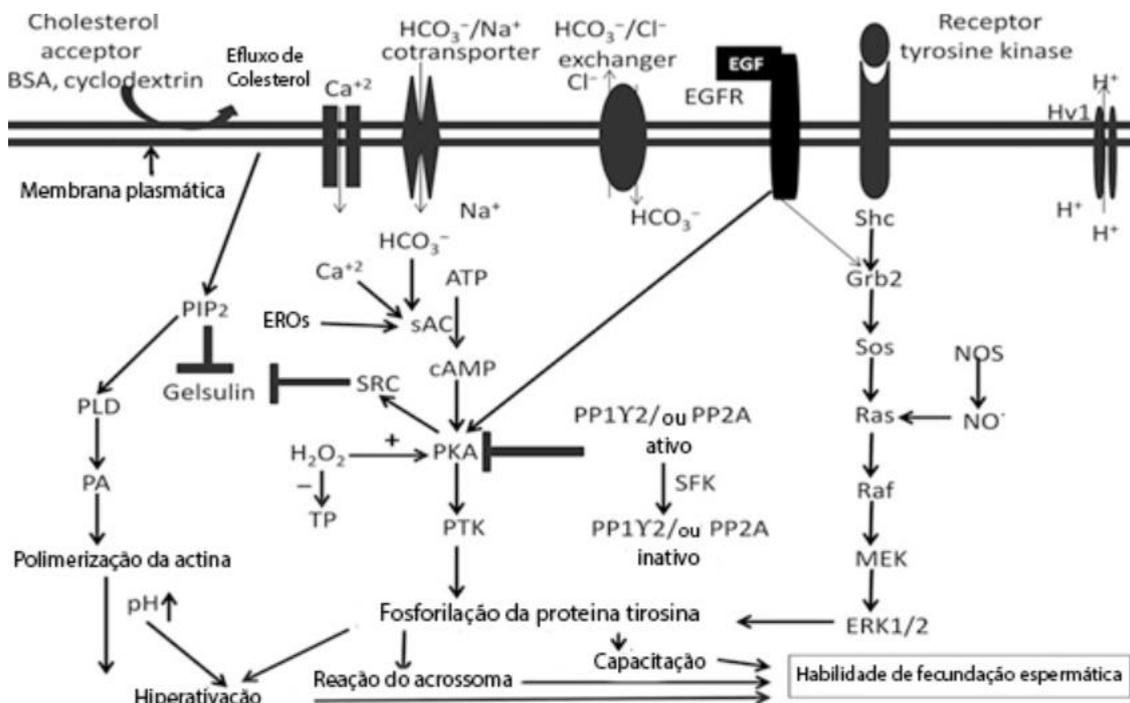


Figura 5. Representação diagramática da maturação funcional dos espermatozoides e eventos associados. A sinalização inicia com o efluxo de colesterol da membrana, levando ao aumento da permeabilidade e permitindo a entrada de íons bicarbonato e cálcio. Os íons cálcio, íons bicarbonato e espécies reativas de oxigênio (EROs) ativam a adenilato ciclase que produz o AMPc a partir do ATP, ativando a PKA. O EGF se liga ao seu receptor levando à ativação das vias PKA e MAPK. A presença de H_2O_2 aumenta a atividade da PKA e diminui a atividade da tirosina fosfatase. O SFK desativa as fosfatases. Tais ações levam à fosforilação da tirosina de proteínas. O pH aumenta devido à atividade de diferentes canais, como o cotransportador de bicarbonato de sódio, o transportador de troca de íons cloreto e bicarbonato, os canais Hv1 e CatSper. A PKA ativa a SRC quinase (tirosina quinase), a qual, juntamente com o PIP2 (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato) inibem a atividade da gelsolina, resultando na ativação de PLD (fosfolipase D) e, portanto, formação de ácido fosfatídico (PA), induzindo polimerização de actina. A hiperativação é resultado do aumento do pH, polimerização da actina e fosforilação da proteína tirosina. A capacidade fecundante do espermatozide é um resultado coletivo da capacitação, hiperativação e reação acrossômica. Fonte: modificado de Gangwar & Atreja (2015).

2.3 Plasma Seminal

O plasma seminal é uma secreção proveniente da contribuição conjunta dos fluidos da cauda do epidídimo e das glândulas sexuais acessórias e, portanto, apresenta uma composição química heterogênea e complexa, possuindo substâncias orgânicas e inorgânicas que desempenham ações variadas tanto no trato reprodutivo do macho quanto no da fêmea, após a ejaculação (MANN, 1978; VILLEMURE *et al.*, 2003). O plasma seminal contém eletrólitos, frutose, ácido ascórbico (vitamina C), proteínas, enzimas e vitaminas, hormônios e fatores de crescimento, que variam entre animais e entre ejaculados do mesmo animal (STRZEZEK *et al.*, 2005; VILLEMURE *et al.*, 2003). Durante o período de armazenamento na cauda do epidídimo, o espermatozoide já possui capacidades fecundante e de motilidade (GARNER; HAFEZ, 2004). No epidídimo, os espermatozoides se encontram em estado de quiescência, permanecendo imóveis, muito em função do baixo pO_2 , o que susta o metabolismo, e do elevado pCO_2 , que eleva as concentrações locais de H^+ , reduzindo o pH. Os componentes do fluido epididimário exercem função protetora aos espermatozoides. Entretanto, os diferentes componentes do plasma seminal, após a ejaculação, possuem tanto efeitos descapacitantes como protetores aos espermatozoides (GADELLA; BOERKE, 2016; MUIÑO-BLANCO *et al.*, 2008; YANAGIMACHI, 1994).

Os componentes do plasma seminal são essenciais para manter o metabolismo do espermatozoide. O pH, a osmolaridade e as proteínas seminais são os principais contribuintes para a função espermática em mamíferos (MAXWELL *et al.*, 2007). As proteínas do plasma seminal ovino desempenham um papel importante na conservação seminal (BARRIOS *et al.*, 2000), possuindo ação descapacitante e estabilizando a membrana espermática ao se ligarem e restaurarem a membrana de espermatozoides danificados (BARRIOS *et al.*, 2000, 2005; CROSS, 1993). Dentre as proteínas presentes no plasma, as BSPs são as mais abundantes na espécie ovina (SOLEILHAVOUP *et al.*, 2014). Na espécie bovina, as BSPs contribuem para a redução na qualidade do sêmen durante o manuseio *in vitro* prolongado, causada pelo efluxo de colesterol que ocorre nos espermatozoides, que é um processo fundamental para a capacitação (LEAHY; DE GRAAF, 2012; THÉRIEN *et al.*, 1998).

Durante a estação reprodutiva ovina é observada uma maior concentração de proteínas no plasma seminal (MAXWELL *et al.*, 2007; SMITH *et al.*, 1999). Moura *et al.* (2010) relataram que ejaculados de carneiros com menores concentrações de proteínas apresentaram maior motilidade espermática após a descongelação. No entanto, em uma maior concentração de proteínas, houve uma maior integridade da membrana plasmática espermática. Mann e Lutwak-Mann (2012) utilizaram o termo 'efeito de diluição' para descrever a redução de motilidade, atividade metabólica e capacidade fecundante, ou mesmo a morte dos espermatozoides, quando a proporção de plasma seminal no ejaculado é reduzida por diluição ou por lavagem (MUIÑO-BLANCO *et al.*, 2008). Esse efeito influencia as estruturas dos espermatozoides, incluindo uma possível desestabilização da membrana, que pode resultar em morte celular. Estudos com sêmen equino sugerem que algumas proteínas do plasma induzem a capacitação dos espermatozoides após o processo de criopreservação, o que prejudica a fecundação. Protocolos com adição de plasma seminal ao ejaculado de garanhões mostraram-se ineficientes por haver a necessidade de se personalizar diferentes quantidades equimolares para cada garanhão (AL-ESSAWE *et al.*, 2018).

Em ovinos, Mata-Campuzano *et al.* (2015) demonstraram que a adição de plasma seminal exógeno ao ejaculado apresentava resultados positivos. No entanto, Paul *et al.* (2018) demonstraram que a remoção do plasma seminal melhorou significativamente a cinética e a viabilidade espermática, e integridade de membrana plasmática e acrossomal quando o sêmen foi resfriado entre 3 e 5°C, apresentando resultados ainda melhores com a adição do plasma após o resfriamento, o que sugere que o plasma seminal pode causar danos às células espermáticas durante o resfriamento.

Em outras espécies, a retirada do plasma seminal é considerada benéfica. Em estudos com equinos concluiu-se que concentrações acima de 25% de plasma seminal podem ser prejudiciais à qualidade do espermatozoide (ALMEIDA, 2006). Porém, em ovinos, dado a grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados presentes na membrana plasmática dos espermatozoides, os quais são os principais alvos da lipoperoxidação induzida por EROs, a remoção do plasma seminal leva a alterações estruturais e funcionais das membranas celulares e das organelas espermáticas (SIKKA,

1996; SOUZA *et al.*, 2016). As proteínas contidas no plasma do sêmen ovino são adsorvidas na superfície do espermatozoide submetido a choque térmico, e essa adsorção é capaz de reverter as alterações da membrana induzidas pelo choque (PEREZ-PE *et al.*, 2001).

O plasma seminal de mamíferos é um modulador chave da funcionalidade do ejaculado, exercendo um efeito descapacitante, conforme comprovado por ensaios *in vitro* com espermatozoides suínos (SUZUKI *et al.*, 2002). Certas lesões celulares causadas pela crioconservação podem ser evitadas pela adição de plasma seminal, responsável por uma melhoria nos parâmetros de qualidade e fertilidade espermática após a inseminação artificial em ovinos (MAXWELL *et al.*, 1999). Mendoza *et al.* (2013) demonstraram que as proteínas do plasma seminal podem melhorar a sobrevivência dos espermatozoides ovinos não apenas agindo na membrana plasmática, mas também inibindo a capacitação, resultando em melhor capacidade de fecundação dos espermatozoides. Sendo assim, a ligação de certas proteínas do plasma seminal aos espermatozoides pode reduzir eventos relacionados à capacitação e reação acrossômica. Essas proteínas foram descritas como "fatores descapacitantes" e devem ser removidas, modificadas ou bloqueadas antes que os espermatozoides sofram a reação acrossômica, um processo essencial para a fecundação (MANJUNATH; THÉRIEN, 2002; YANAGIMACHI, 1994).

O uso de diluidores de sêmen se faz necessário para a conservação do sêmen visando à inseminação artificial (SALAMON; MAXWELL, 2000). Porém, seu uso implica também na diluição do ejaculado, e por conseguinte, do plasma seminal, reduzindo a participação na função espermática. A interação de componentes de diluidores seminais à base de gema de ovo ou leite poderia ter implicações quanto ao modo ideal de adição de proteínas do plasma seminal. A afinidade das proteínas do plasma seminal que apresentam domínios de fibronectina tipo II (proteínas BSP) ao LDL ou à caseína em diluidores à base de gema de ovo ou leite, respectivamente, pode implicar em uma interação de relevância biológica destas proteínas com os diluidores seminais, de modo que o LDL e a caseína sequestrariam tais proteínas, tornando-as menos disponíveis para exercer seus efeitos na membrana espermática (BERGERON; MANJUNATH, 2006), o que pode promover uma indução prematura da capacitação espermática, entre outros efeitos potencialmente deletérios aos

espermatozoides que podem reduzir a capacidade fecundante. Leahy *et al.* (2012) avaliaram que, ao contrário do que ocorre em bovinos na adição de BSP, a adição de proteínas do plasma seminal ovino durante o processamento do sêmen resulta em maior percentual de espermatozoides viáveis com acrossomo intacto comparada à adição de tais proteínas ao diluente para criopreservação, ainda que ambos os métodos tenham promovido um aumento da qualidade dos espermatozoides após a criopreservação.

2.3.1 Concentração espermática e diluentes

A otimização das doses de sêmen e a utilização de programas de seleção animal tem direcionado o interesse para o congelamento utilizando baixas concentrações de espermatozoides. Porém, o congelamento, em altas concentrações, pode ser interessante em alguns casos, como no *Ictalurus furcatus* (bagre azul), onde não parece ser prejudicial para a criopreservação de espermatozoides (HU *et al.*, 2011). No entanto, em mamíferos, se de um lado a diluição do plasma seminal pode causar efeitos deletérios aos espermatozoides, de outro lado, o aumento da concentração de espermatozoides para congelamento também pode ter consequências indesejáveis, superando as possíveis vantagens de tal abordagem (ALVAREZ *et al.*, 2012; MAXWELL; JOHNSON, 1999).

Na IA com sêmen ovino congelado os resultados são variáveis e geralmente apresentam baixa fertilidade quando aplicada por inseminação vaginal ou cervical (ALVAREZ *et al.*, 2012; LEAHY *et al.*, 2010; SALAMON; MAXWELL, 2000). A eficiência da inseminação artificial com sêmen congelado não é satisfatória em comparação ao sêmen *in natura*, eficiência que pode ser apenas parcialmente compensada com a utilização de uma elevada concentração espermática na dose inseminante (100 a 400×10^6 espermatozoides/dose; D'ALESSANDRO *et al.*, 2001; WATSON, 1995). Por outro lado, na IA laparoscópica pode-se utilizar uma concentração espermática reduzida (20 a 50×10^6 espermatozoides/dose; LEBOUÉF *et al.*, 2000).

O resfriamento é uma etapa importante na conservação do sêmen, para a redução do metabolismo espermático, manutenção de reservas energéticas, diminuição de crescimento microbiano, e manutenção da viabilidade e integridade física, bioquímica e metabólica das células. Quando *in natura*, o

espermatozoide mamífero é muito sensível ao resfriamento, com o dano causado pelo choque térmico ocasionando uma perda irreversível na sua viabilidade pela rápida diminuição ou surgimento de padrão anormal da motilidade, que passa a ser circular ou retrógrado (WATSON, 2000). Também há uma redução da taxa de glicólise, da respiração celular e da frutólise, e aumento dos danos ao DNA (HOLT, 2000; SAID *et al.*, 2010). Durante a redução de temperatura ocorre a transição de fase dos lipídeos da membrana, passando da fase líquida para a cristalina, com tal mudança resultando em uma organização mais rígida da membrana (AMANN; PICKETT, 1987; CHAKRABARTY *et al.*, 2007; MALDJIAN *et al.*, 2005; REDDY *et al.*, 2010). Desta forma, o resfriamento do sêmen, seja para uso de sêmen refrigerado ou congelado, é uma etapa que deve estar associada à diluição do sêmen com diluentes que mantenham o máximo da viabilidade espermática do sêmen fresco imediatamente após a coleta (LIU *et al.*, 1998; MAIA, 2015).

No processo da IA temos o aproveitamento genético do macho otimizado, que pode ser realizado de forma imediata, ou programada para uso posterior à coleta e diluição, podendo ser de horas ou dias, no caso de sêmen refrigerado, ou indeterminado, no caso de sêmen congelado (LOPEZ-SAEZ *et al.*, 2000; PAULENZ *et al.*, 2002). No processo de diluição, deseja-se então que não haja alteração em nenhum parâmetro espermático, o que se mostra um desafio técnico importante, que varia conforme a espécie, raça, indivíduo e até ejaculados de um mesmo indivíduo. Para reduzir os danos causados pelo processamento do sêmen é vital o uso de diluentes adequados, os quais devem suprir as células com uma fonte de substrato energético, devem protegê-las contra os danos físico-químico-metabólicos da redução térmica e devem manter um ambiente físico-químico adequado à sobrevivência do espermatozoide (HERNÁNDEZ-AVILÉS *et al.*, 2020; KATILA, 1997; PURDY, 2006; SALAMON; MAXWELL, 2000).

As principais propriedades que um bom diluente deve apresentar incluem valores de pH e osmolaridade próximas à fisiológica (6,8 e 300 mOsm em ovinos; OLIVEIRA *et al.*, 2011), com bom efeito tamponante, capacidade de prevenir a capacitação espermática precoce, manutenção da capacidade metabólica das células, e proteção das membranas e de organelas de eventuais alterações físico-químicas (SALAMON; MAXWELL, 1995). Os componentes básicos dos

diluentes utilizados na preservação do sêmen ovino normalmente incluem (a) agentes osmoticamente ativos (p. ex., citrato de sódio); (b) agentes tamponantes (p. ex., Tris), que mantenham o pH e a osmolaridade da solução dentro de padrões fisiológicos; (c) um crioprotetor não permeável (p. ex., leite ou gema de ovo), que protege os espermatozoides durante o resfriamento em temperaturas acima do ponto de congelação; (d) substratos energéticos (p. ex., glicose, frutose); e (e) substâncias antimicrobianas (p. ex., penicilina, estreptomicina, gentamicina), visto que o sêmen não é material biológico estéril, e o diluente é ambiente propício ao crescimento microbiano indesejado (HOLT, 2000; MAIA, 2015). Inclui-se um agente crioprotetor permeável em diluentes para a criopreservação (p. ex., glicerol), para temperaturas abaixo do ponto de congelação. Estes agentes crioprotetores possuem a capacidade de alteração de propriedades coligativas (p.ex., ponto de fusão) e não-coligativas (p.ex., tamanho e forma de cristais de gelo) da solução, além de serem importantes para promover a perda de água das células, fatores importantes no processo de criopreservação (BITTENCOURT *et al.*, 2013; MOLINIA *et al.*, 1994).

Muitos diluentes já foram testados para o sêmen ovino, mas o diluente Tris-gema-de-ovo e o leite em pó desnatado diluído são os mais comumente utilizados, alcançando-se resultados satisfatórios na preservação do sêmen (ARI *et al.*, 2011; PURDY, 2006; SALAMON; MAXWELL, 2000). O Tris (2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol) possui boa capacidade tamponante, atividade osmótica e baixa toxicidade em altas concentrações (NAHAS, 1961). No leite desnatado, as micelas de caseína protegem o espermatozoide ovino durante o armazenamento (MARTIN, 1966), reduzindo a perda lipídica e mantendo a motilidade e viabilidade espermática (BERGERON *et al.*, 2007). Tal diluente pode atuar como tampão, para prevenir alterações do pH, e como quelante, contra a presença de metais pesados no meio (SALAMON; MAXWELL, 2000). Segundo Peterson *et al.* (2007), o diluente à base de Tris proporciona uma maior proporção de espermatozoides vivos com acrossomo intacto após a descongelação do que com o leite glicerolado.

A gema de ovo é utilizada em diluentes de sêmen para prevenir que os espermatozoides sofram choque térmico no resfriamento, pelo efeito protetor das lipoproteínas de baixa densidade (LDL; WATSON; MARTIN, 1975). Porém, a ação do LDL ainda não está totalmente esclarecida (SILVA, 2014). Segundo

Manjunath *et al.* (2002), em bovinos, o LDL demonstrou proteger a membrana espermática ao associar-se com as proteínas do plasma seminal, prevenindo assim que ocorresse o efluxo de colesterol da membrana (BERGERON; MANJUNATH, 2006; KULAKSIZ *et al.*, 2010).

Muitos fatores influenciam a sobrevivência e a funcionalidade dos espermatozoides congelados, mas o efeito da concentração de espermatozoides na dose na preservação do sêmen é pouco explorado. Em ovinos, D'Alessandro *et al.* (2001) testaram dois tipos de diluentes, o Leite-lactose-gema de ovo e o Tris-frutose-gema de ovo, congelando em seis diferentes concentrações de espermatozoides (50, 100, 200, 400, 500 e 800 x 10⁶ células/mL). A interação concentração-diluyente indicou uma maior taxa de sobrevivência dos espermatozoides com Tris na concentração de 50 x 10⁶ espermatozoides/mL e no Leite com 100 x 10⁶ espermatozoides/mL e 500 x 10⁶ espermatozoides/mL. A maior proporção de espermatozoides com acrossomos intactos (71,5%) foi observada em amostras congeladas em Leite na concentração de 500 x 10⁶ espermatozoides/mL, mas o congelamento com 800 x 10⁶ espermatozoides/mL obteve uma queda visível de integridade de acrossomo (35,5%). Embora tais resultados sugiram um efeito negativo do aumento das concentrações de espermatozoides, os autores não chegaram a conclusões definitivas, mas diversos estudos em várias espécies parecem suportar tal hipótese. Já estudos com sêmen equino e canino mostraram decréscimos na motilidade espermática e viabilidade pós-descongelamento com concentrações de 400 x 10⁶ espermatozoides/mL (NASCIMENTO *et al.*, 2008; PEÑA; LINDE-FORSBERG, 2000).

2.4 Métodos de avaliação da capacitação

Desde a descoberta da capacitação espermática, vários métodos foram desenvolvidos para avaliar este complexo processo biológico, em sua maioria pelo uso de sondas fluorescentes. A análise fluorescente é um método que possui duas formas de análise em nível celular, por microscopia fluorescente ou citometria de fluxo. Uma avaliação padronizada e confiável da capacitação e a seleção de métodos de detecção confiáveis é um pré-requisito metodológico para a avaliação da qualidade do potencial fecundante de espermatozoides

individuais e da população de espermatozoides exposta a fatores fisiológicos ou ambientais (DED *et al.*, 2019).

Existem quatro métodos fluorescentes principais de avaliação da capacitação espermática, cada qual tendo como alvo uma característica diferente dos espermatozoides. O método CTC (clortetraciclina) detecta a redistribuição do cálcio intracelular na cabeça do espermatozoide durante a capacitação (MAXWELL; JOHNSON, 1997). A primeira descrição do ensaio de fluorescência com clortetraciclina (CTC) para avaliação do *status* de capacitação foi realizada em espermatozoides de camundongos (WARD; STOREY, 1984) e posteriormente aplicado a outros mamíferos (CORMIER *et al.*, 1997). Da mesma forma, diferentes estudos mostraram que a CTC pode ser utilizada para avaliar mudanças semelhantes à capacitação em espermatozoides ovinos (GILLAN *et al.*, 1997; GRASA *et al.*, 2006; PEREZ *et al.*, 1996; PEREZ-PE *et al.*, 2001). A CTC é considerada a técnica mais representativa na análise por microscopia de fluorescência do estado de capacitação dos espermatozoides (MARTINEZ-PASTOR *et al.*, 2010), apesar de ter como desvantagem a difícil avaliação dos padrões individuais de fluorescência de células sob o microscópio fluorescente e uma fotodegradação rápida (WARD; STOREY, 1984). Outro método é o uso de anticorpo anti-acrossina (ACR.2), o qual reconhece o rearranjo da matriz acrossomal detectando mudanças na acessibilidade dos epítomos de acrossina (PEKNICOVA *et al.*, 1994). Quanto maior a acessibilidade dos epítomos de acrossina, mais significativo é o marcador do progresso da capacitação (DED *et al.*, 2010). Já o isotiocianato de fluoresceína (FITC)-faloidina liga-se à F-actina, pois a polimerização da actina aumenta significativamente durante o progresso da capacitação (BRENER *et al.*, 2003). Anticorpos conjugados com isotiocianato de fluoresceína, como o anti-fosfotirosina (anti-pY), detectam proteínas fosforiladas na superfície de espermatozoides capacitados (PIEHLER *et al.*, 2006). Por fim, a merocianina 540 (M540) pode ser utilizada como alternativa para a detecção de capacitação (HARRISON *et al.*, 1996). Tal sonda lipofílica se liga ao plasmalema, e sua fluorescência aumenta com a diminuição de fosfolipídios na membrana, um dos eventos que ocorre durante a capacitação (MARTINEZ-PASTOR *et al.*, 2010).

2.5 Refrigeração

O armazenamento do sêmen ovino preservado pelo método de refrigeração consiste no armazenamento temporário a temperaturas baixas o suficiente para inibir de forma reversível o metabolismo das células (15°C ou 5°C; PALHÃO *et al.*, 2006), possibilitando desta maneira o emprego do ejaculado em diferentes cenários da IA. Porém, existe a possibilidade do processo de refrigeração afetar a viabilidade celular por causa do efeito prejudicial do choque térmico que pode ocorrer entre as temperaturas de 30°C e 0°C, já que uma mudança brusca nesta faixa de temperatura pode induzir alterações na membrana plasmática e acrossomal, o que pode por sua vez afetar a motilidade espermática e a capacidade fecundante. Com um resfriamento gradual do sêmen, e uma suplementação com diluente com substâncias lipoproteicas como a gema de ovo ou o leite desnatado, tal efeito deletério pode ser parcialmente superado (ANEL *et al.*, 2006; SALAMON; MAXWELL, 2000; WATSON, 2000).

Independente do diluente, da taxa de diluição e da temperatura de armazenamento após o resfriamento, é observada uma redução mais acentuada da qualidade espermática à medida em que se aumenta o tempo de incubação, sendo que as principais ocorrências observadas são a diminuição da motilidade espermática e da integridade morfológica, eventos provavelmente estimulados pelo acúmulo de produtos do metabolismo, principalmente EROs, que diminuem o transporte e a sobrevivência dos espermatozoides no trato genital feminino (AISEN *et al.*, 2005; SALAMON; MAXWELL, 2000). Druart *et al.* (2009) realizaram um estudo com microscopia confocal *in situ*, para avaliar o efeito que a refrigeração do sêmen ovino teve sobre o trânsito espermático no trato genital feminino após a IA, observando que a refrigeração do sêmen por 24 h antes da IA cervical reduziu a capacidade de migração dos espermatozoides através da cérvix e também reduziu o número de espermatozoides móveis com deslocamento linear em direção à junção útero-tubárica, assim como o trânsito no lúmen da tuba uterina.

Visando melhorar os resultados da refrigeração do sêmen ovino, diversas variações de composições de diluentes têm sido testadas. O'Hara *et al.* (2010) utilizaram os diluentes leite-gema-de-ovo e três diluentes comerciais (AndroMed, OviPro ou INRA 96) para incubar o sêmen a 5°C ou a 15°C por até 72 h, na concentração de 800×10^6 espermatozoides/mL, observando efeitos negativos

tanto na viabilidade quanto na motilidade espermática, independente do diluente utilizado. Mesmo assim, a viabilidade se mostrou praticamente estável a 5°C no intervalo entre 24 h e 74 h após a coleta das amostras. Já a 15°C, ocorreu um declínio linear significativo de acordo com o tempo. Paulenz *et al.* (2002) em um experimento que comparou as temperaturas de 5° e de 20°C empregando diferentes diluentes (leite-gema-de-ovo 5%, citrato-gema 20%, Tris-gema 20% e Tris comercial-gema 20%), com a concentração espermática ajustada para 500×10^6 espermatozoides/mL, os autores observaram que a temperatura interagiu com o diluente apenas sobre a motilidade espermática, mas não apresentou diferença quanto à integridade de membrana, de acrossomo, no teste hiposmótico e na capacitação espermática. Porém, independente da temperatura ou do diluente, todos os parâmetros apresentaram redução ao longo do período de incubação utilizado, com uma redução não tão acentuada após a incubação do sêmen a 5°C, em relação à temperatura de 20°C.

A taxa de diluição do sêmen ovino mantido sob refrigeração também pode interferir na qualidade espermática. Em um estudo mantendo o sêmen ovino a 4°C durante oito dias com diluentes a base de leite desnatado a 11%, suplementado com 20% de gema de ovo e 11% de lecitina de soja, relatou-se que a concentração de 50 milhões de espermatozoides/mL resultou em maior fragmentação de DNA após quatro dias de incubação, diminuição de integridade de membrana a partir do sexto dia de incubação e de motilidade progressiva a partir do primeiro dia, quando comparada à concentração de 200 milhões de espermatozoides/mL. A maior concentração espermática apresentou pequena influência nos parâmetros da cinética espermática sem influenciar os parâmetros de velocidade média do trajeto e velocidade linear dos espermatozoides (KASIMANICKAM *et al.*, 2011).

2.5.1 Capacitação espermática induzida pela manipulação e processamento do sêmen

Mesmo que os diluentes de sêmen busquem a manutenção integral das características seminais durante e após o processamento, observou-se em diferentes espécies (bovinos: BAILEY *et al.*, 2003; CORMIER *et al.*, 1997; caninos: SETYAWAN *et al.*, 2016) que, após o reaquecimento ou descongelação do sêmen, uma parte dos espermatozoides apresenta características

semelhantes à capacitação espermática *in natura*, denominada de criocapacitação, processo não desejável e potencialmente deletério à fertilidade (Figura 6). Um espermatozoide capacitado ou com acrossomo reagido tem sua expectativa de vida reduzida, o que, conseqüentemente, compromete a taxa de fertilidade da dose inseminante (PONS-REJRAJI *et al.*, 2009). A capacitação mais acelerada do sêmen de carneiro criopreservado em comparação ao sêmen *in natura* foi demonstrada por Perez *et al.* (1996) com a utilização da coloração fluorescente CTC, sendo confirmada por Cormier *et al.* (1997), ao observarem que espermatozoides fecundavam oócitos *in vitro* sem o tratamento prévio de capacitação necessário em espermatozoides não congelados.

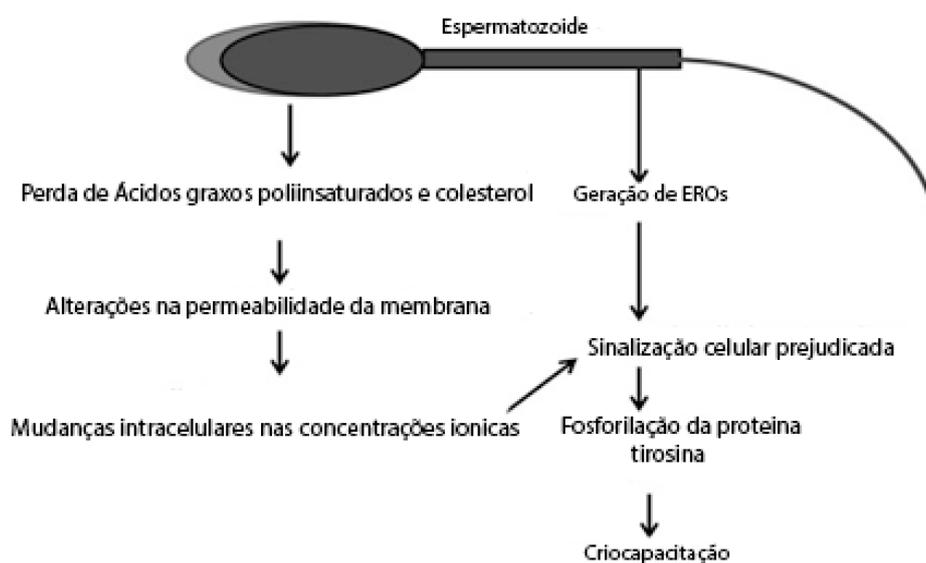


Figura 6. Representação diagramática dos eventos físico-químicos associados ao processo de criocapacitação em espermatozoides mamíferos. Fonte: modificado de Gangwar & Atreja (2015).

Ainda não está completamente desvendado em qual momento do processamento do sêmen os espermatozoides começam a sofrer as mudanças semelhantes à capacitação espermática. A capacitação está associada com a reorganização da membrana plasmática causada pela redistribuição dos fosfolipídios e a retirada do colesterol, e o procedimento de preservação do sêmen induz tais eventos associados à capacitação que favorecem o efluxo de cálcio (HALLAP *et al.*, 2006; LONGOBARDI *et al.*, 2017; RAJORIYA *et al.*, 2020). Ainda é necessário que seja determinado o momento de início da capacitação e o efeito cumulativo durante o processamento do sêmen para prevenir ou retardar

tais mudanças no espermatozoide, assim obtendo um armazenamento mais eficiente e melhores taxas de fertilidade (ANDRADE, 2009).

2.6 Aerobiose

A célula espermática apresenta a propriedade de ser metabolicamente flexível em relação à utilização do oxigênio para seu metabolismo, podendo em algumas espécies se manter entre aeróbico e anaeróbico (CUMMINS; JEQUIER, 1994). Porém, a utilização do metabolismo oxidativo como principal fonte de energia é capaz de gerar EROs. Dentre estes, pode-se destacar o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^{\cdot}) (BAKER; AITKEN, 2004; SILVA, 2006; TREMELLEN, 2008).

Em situações em que há desequilíbrio na concentração de EROs, seja pelo aumento de sua produção ou pela diminuição da atividade de substâncias antioxidantes, pode-se afirmar que o sistema se encontra no estado de EO (SIKKA, 1996). Se de um lado a presença de EROs é fisiológica ao processo de capacitação espermática, por outro, esta condição pode estar associada ao aumento da ocorrência de danos celulares, com consequente redução da fertilidade, e mesmo à indução precoce da capacitação antes da deposição do sêmen no trato reprodutivo feminino (WANG *et al.*, 2003).

Com a ejaculação, os espermatozoides que estão na porção distal da cauda do epidídimo ou já em trânsito no canal deferente em função dos estímulos pré-copulatórios são combinados aos produtos da secreção das glândulas sexuais acessórias, compondo o sêmen ou ejaculado quando emitido pelo órgão copulador masculino (SENGER, 2003). Os espermatozoides saem do estado de quiescência da cauda do epidídimo determinado pela baixa pO_2 , elevado pCO_2 e baixo pH, para serem metabolicamente estimulados à motilidade, pela elevação do pH a níveis próximos ao neutro, pela presença de substratos energéticos do plasma seminal, e pela exposição a ambiente com maior pO_2 , seja *in vivo*, no trato reprodutivo da fêmea, ou *in vitro*, em copo coletor após a coleta de sêmen. Desta forma, há a ativação do metabolismo oxidativo e geração de ATP para ativar o mecanismo de motilidade dos microtúbulos axonemais do flagelo, que é temperatura-dependente (NG *et al.*, 2017).

Quando *in vivo*, há estímulo máximo de motilidade espermática pela temperatura no trato reprodutivo da fêmea, que pode variar ligeiramente

conforme a porção da genitália tubular em análise (NG *et al.*, 2017). *In vitro*, visa-se reduzir a temperatura do sêmen fresco para níveis abaixo da espermatogênese (34°C), reduzindo o metabolismo, salvaguardando a qualidade espermática, tomando-se cuidado para não reduzir excessivamente a temperatura (20 a 30°C). Dependendo da porção da genitália tubular, a pO₂ no trato reprodutivo feminino pode ser 60 a 90% menor do que a pO₂ atmosférica, que se situa ao redor de 20% ou 160 mmHg. *In vivo*, com a temperatura corporal, a pO₂ relativamente baixa na fêmea é suficiente para ativar o metabolismo oxidativo e motilidade espermática máxima, havendo um balanço entre os componentes antioxidantes presentes no plasma seminal e no trato reprodutivo da fêmea e a liberação de EROs pela atividade mitocondrial, que no processo de transporte espermático e chegada na tuba uterina, resultará em eventos físico-bioquímicos que favorecerão a capacitação espermática (NG *et al.*, 2017), conforme já descrito acima. Por outro lado, em condições *in vitro*, os desafios causados pelas condições sub-ótimas tendem a causar danos e alterações aos espermatozoides, em função da temperatura e tempo de exposição ao ar atmosférico, da diluição ou não do sêmen, e do tipo e componentes do diluente, fator de diluição, curva de resfriamento, entre outros (NG *et al.*, 2017; PAULENZ *et al.*, 2002).

Conforme acima, há diversos fatores que tendem a comprometer a viabilidade espermática quando em condições *in vitro*. Em processo sabidamente não ótimo, visa-se mimetizar as condições de anabiose biológica (MIES FILHO, 1987) durante o processamento do sêmen, em geral, pela redução da temperatura, com a utilização de componentes no diluente que protejam os espermatozoides de efeitos deletérios do ambiente e do resfriamento (ANEL *et al.*, 2006; SALAMON; MAXWELL, 2000). Um dos aspectos deletérios em questão se refere à exposição à elevada pO₂ durante o processamento e armazenamento, em especial, com respeito ao sêmen refrigerado, que pode predispor a geração excessiva de EROs em função do tempo (AGARWAL *et al.*, 2014). Estas EROs podem apresentar efeitos deletérios pelo efeito oxidante, em especial sobre os ácidos graxos poli-insaturados das células espermáticas, e a ligação destes ácidos graxos com o oxigênio leva à produção de maiores quantidades de EROs (BISHT *et al.*, 2017; GADEA *et al.*, 2013; LONE *et al.*, 2018; SARLOS *et al.*, 2002).

3. HIPÓTESES E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

- a) O processo de capacitação espermática ocorre gradativamente desde a coleta do sêmen ovino, sofrendo variação de acordo com o tipo de diluente, o fator de diluição e a condição de aerobiose durante a refrigeração a 5°C por até 72 h.

3.2 Objetivo Geral

- a) Determinar o *status* de capacitação espermática e reação acrossomal durante a dinâmica de processamento para a refrigeração do sêmen ovino, com avaliação imediatamente após a coleta do sêmen, a diluição do ejaculado e durante o processo de armazenamento por refrigeração a 5°C por até 72 h.

3.3 Objetivos específicos

- a) Determinar e relacionar as características macro- e microscópicas e o *status* da capacitação espermática e reação acrossomal do sêmen ovino fresco após a ejaculação, sem diluição.
- b) Determinar e relacionar as características macro- e microscópicas e o *status* da capacitação espermática e reação acrossomal do sêmen ovino após a diluição do sêmen ovino com três diluentes (TRIS-Gema-de-Ovo, Citrato-Gema-de-Ovo e Leite em Pó desnatado), em dois fatores de diluição (100×10^6 e 1×10^9 espermatozoides/mL), e duas condições de aerobiose (aeróbico ou semi-anaeróbico), antes e após a refrigeração a 5°C, a intervalos de 24 h até 72 h de refrigeração.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Exceto quando indicado, todos os reagentes utilizados nos experimentos foram provenientes da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

4.1 Local de Realização do Estudo e Animais

O experimento foi conduzido em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, junto ao Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução da Faculdade de Veterinária (FAVET) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) durante a primavera no hemisfério sul (Set/Dez) de 2020. Os animais utilizados faziam parte do rebanho de ovinos da FAVET/UFRGS.

4.2 Coleta e Análise do Sêmen Fresco

Foram utilizados dois carneiros adultos de cruzas Texel ou Ile de France com fertilidade comprovada e condicionados à coleta de sêmen pelo método da vagina artificial (VA; MIES FILHO, 1987). O sêmen foi coletado em uma VA (42°C), em coleta asséptica e com material estéril, em tronco de coleta utilizando uma fêmea ovina como manequim (Figura 7).

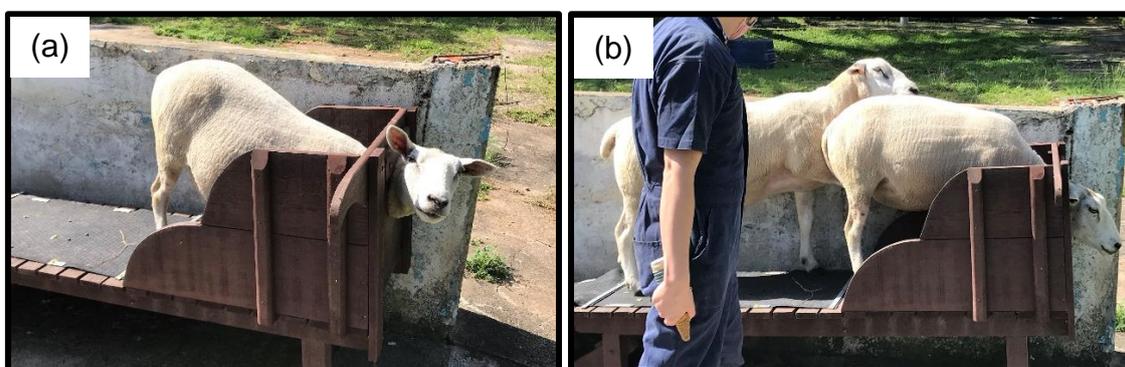


Figura 7. Tronco de coleta com fêmea manequim ovina (a), e fase pré-copulatória do ato sexual de carneiro, com operador em espera para a coleta de sêmen por vagina artificial (b).

Foram coletados dois ejaculados consecutivos por dia de cada carneiro, a intervalo de 5 a 10 min, ao longo de três dias de coletas para cada carneiro, em intervalos de 48 a 72 h. Após cada coleta, os copos coletores contendo cada ejaculado foram mantidos em banho-maria a uma temperatura de 30°C durante o tempo necessário para as avaliações macroscópicas: volume (mL), cor, aspecto, movimento de massa (de 1 a 5) além do odor. Quanto as análises

microscópicas foram avaliados o turbilhonamento (1 a 5), motilidade total (%), vigor de motilidade (1 a 5), concentração (por mm³ e por mL) e morfologia espermática, conforme Mies Filho (1987) e preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

O volume foi averiguado pela leitura direta do copo de coleta graduado. O turbilhonamento foi avaliado subjetivamente em magnitude de 10X, sob microscopia de contraste de fase, mediante a deposição de uma gota de 10 µL de sêmen sobre uma lâmina pré-aquecida. Para a avaliação da motilidade espermática (M) e do vigor de motilidade (V), uma gota de 10 µL do sêmen foi diluída em solução salina tamponada com fosfato (PBS) aquecida a 37°C, entre lâmina e lamínula pré-aquecidas, e a avaliação sob microscopia de contraste de fase (magnitudes de 100 a 400X).

Para a concentração espermática contou-se o número de células espermáticas com o uso da câmara de Neubauer. O sêmen foi diluído em tubo de microcentrífuga contendo uma solução de formol-citrato (4% de formalina em solução de 2,94% de citrato de sódio, pH 7,2) aquecido a 37°C, para a obtenção de uma diluição final de 1:400. Para tanto, foi realizada uma pré-diluição (1:40) com 10 µL de sêmen em 390 µL de formol-citrato, homogeneizado e então, para atingir a diluição final, em novo tubo, foi homogeneizado 20 µL do sêmen pré-diluído em 180 µL de formol citrato (1:400).

Determinada a concentração, estimou-se o número total de espermatozoides por ejaculado, considerando o volume total de cada ejaculado. Uma amostra de 10 µL de sêmen de cada ejaculado foi utilizada para a realização da análise de integridade de membrana pela coloração de azul de tripano e Giemsa (Anexo 1) e de determinação do *status* de capacitação espermática pela coloração fluorescente com clortetraciclina (CTC; Anexo 2), conforme abaixo.

4.3 Diluição e Subdivisões de Amostras

Após a análise e amostragens do sêmen fresco, e após, no máximo, 10 min da coleta do segundo ejaculado, foi realizado um *pool* dos dois ejaculados de cada carneiro (por dia de coleta), em tubo de centrífuga de 15 mL, sendo mantidos em banho-maria à temperatura de 27°C. Determinou-se o volume final e o número total de espermatozoides em cada *pool*. Então, dividiu-se cada *pool*

em três grupos de igual volume em novos tubos, realizando-se uma pré-diluição na proporção de 1:2 (v/v) com os diluentes Leite Desnatado (LD), Citrato-Gema (CG) ou Tris-Gema (TG; Anexo 3), em isoterмия ao sêmen (27°C) e com pH ajustado entre 6,5-7,0. Cada um dos grupos passou por nova análise de motilidade e vigor (M/V), para então serem subdivididos por diluição nas concentrações de 100×10^6 ou 1×10^9 espermatozoides/mL, em novos tubos, para cada diluente, sendo realizada outra análise de M/V. Finalmente, cada amostra foi novamente subdividida em dois novos tubos, onde em um dos tubos foi acrescentada uma camada superficial de óleo mineral (300 μ L) estéril para a obtenção de ambiente semi-anaeróbico, com o outro tubo permanecendo sem óleo (aeróbico). Para cada *pool* de dois ejaculados, avaliaram-se três diluentes (LD, CG, TG), dois fatores de diluição (100×10^6 ou 1×10^9 /mL), e duas condições de aerobiose (aeróbico, semi-anaeróbico), em um total de 12 amostras por *pool* de sêmen, por carneiro, por repetição (Figura 8), com cada tubo sendo devidamente identificado.

4.4 Refrigeração do sêmen

Os tubos, devidamente identificados (carneiro, diluente, diluição e aerobiose) e em banho-maria, foram resfriados gradualmente de 27°C até 5°C (T0) em câmara de refrigeração (geladeira) em aproximadamente 3 h, em uma curva de resfriamento média de 0,12°C/min. Os tubos foram mantidos em resfriamento controlado em 5°C/72 h, sendo retiradas amostras de cada tubo para a realização de análises de M/V nos tempos T0, T24 (24 h), T48 (48 h) e T72 (72 h), considerando o momento de estabilização a 5°C como T0, e amostras para avaliação do *status* da capacitação espermática e viabilidade celular nos tempos T0 e T72.

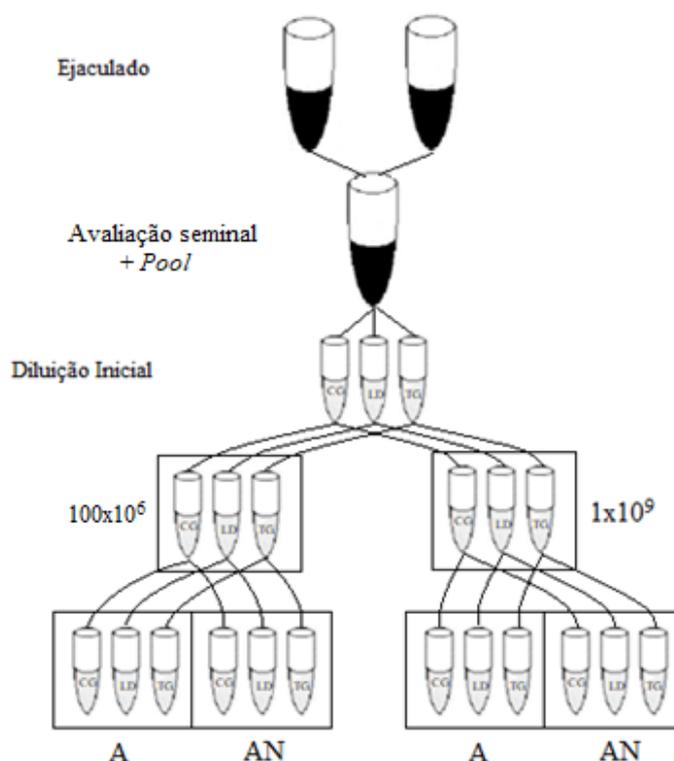


Figura 8. Diagrama com o delineamento experimental por carneiro, denotando os dois ejaculados consecutivos obtidos por dia de coleta, seguido das avaliações macro- e microscópicas e formação do *pool* de ejaculados antes da diluição com três diluentes (CG, LD, TG), em dois fatores de diluição (100×10^6 , 1×10^9), e duas condições de aerobiose (A, NA) antes do resfriamento até 5°C.

4.5 Determinação do *status* de Capacitação e da Integridade de Membrana

Para a avaliação do *status* de capacitação *in vitro* dos espermatozoides, foi realizada a técnica de coloração fluorescente com clortetraciclina (CTC), de acordo com Pérez *et al.* (1996). Foram coletadas alíquotas de 10 μ L de cada ejaculado fresco, e do sêmen de cada sub-grupo, de acordo com o diluente, diluição e aerobiose, nos tempos $t = 0$ h (T0) e $t = 72$ h (T72). Para a remoção do diluente, as amostras de cada sub-grupo diluído foram centrifugadas a 2000 rpm/10 min em gradiente de MiniPercoll®, de acordo com Machado *et al.* (2009), com os *pellets* sendo ressuspensos (individualmente) em Sperm TALP e centrifugados novamente a 1000 rpm por 5 min. Em seguida, em sala escura, 5 μ L de cada amostra foram colocados em um tubo de microcentrífuga com 10 μ L de CTC (4 mg/mL de CTC; 1:3, v/v; pH: 7,8) e incubados por 1 min sobre placa aquecida a 37°C. Após, foram acrescentados 10 μ L de paraformaldeído a 12% para a fixação das amostras, seguida da homogeneização, sobre lâmina, para ser encoberto com lamínula. As amostras devidamente identificadas foram então armazenadas em caixas para proteção à luz e refrigeradas a 4-5°C por um tempo

mínimo de 4 h. Em microscópio de epifluorescência, avaliou-se as amostras sob filtro (excitação/emissão de 355/425 nm, filtro RKP 455), pela contagem de 200 células, em aumento de 1000x, sob imersão. O Atlas Embrapa (MARTINS *et al.*, 2016) foi utilizado como parâmetro na interpretação da coloração dos espermatozoides, havendo três níveis como padrão de avaliação de capacitação espermática: 1) espermatozoides não capacitados (NCA), os quais apresentavam fluorescência brilhante em toda a cabeça; 2) espermatozoides capacitados (CA), apresentando ausência ou baixa taxa de fluorescência na região pós-acrossomal, e fluorescência brilhante na região acrossomal; e 3) espermatozoides com acrossomos reagidos (RA), apresentando ausência ou baixa fluorescência na cabeça, com um anel fluorescente na região equatorial espermática (Figura 9).

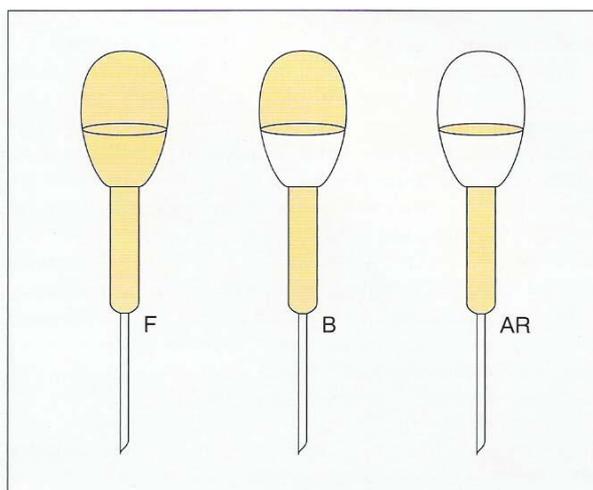


Figura 9. Padrões de colorações epifluorescentes com fluorocromo clortetraciclina (CTC) em espermatozoides ovinos, sob iluminação de epifluorescência a 1000x. **F:** Espermatozoide não capacitado (NCA); **B:** Espermatozoide capacitado sem reação acrossômica (CA); **AR:** Espermatozoide capacitado com reação acrossômica (RA). Fonte: Curry (2000).

Da amostra centrifugada, descrita acima, também foram coletados 10 μ L, sendo dispostos em tubo de microcentrífuga contendo 10 μ L de azul de tripano a 0,4%. Após homogeneização e incubação por 10 min sobre placa aquecida a 37°C, foi então realizado um esfregaço em lâmina pré-aquecida. As amostras em lâminas foram fixadas em álcool a 96% por 5 min, sendo em seguida deixadas para secar naturalmente ao ar. As lâminas secas foram imersas em solução de Giemsa e mantidas em incubadora a 38°C por 1 h. Posteriormente, foi removido o excesso de corante com água corrente, deixando as lâminas

secarem à temperatura ambiente. A avaliação das lâminas foi realizada em microscópio de campo claro com a contagem de 200 células, sob imersão, em aumento de 1000x. A interpretação da coloração foi baseada na classificação descrita por Serafini *et al.* (2013) para espermatozoides equinos, em quatro níveis, com a visualização de espermatozoides: 1) vivos com reação acrossomal, com a cabeça corada de rosa-claro e com acrossomo não visível; 2) vivos com acrossomo íntegro, com a cabeça corada de rosa claro e com o acrossomo corado de rosa-escuro; 3) mortos com acrossomo íntegro, com a cabeça corada de azul e com acrossomo corado de rosa-escuro; e 4) mortos com reação acrossomal, com a cabeça corada de azul e com acrossomo não corado (Figura 10).

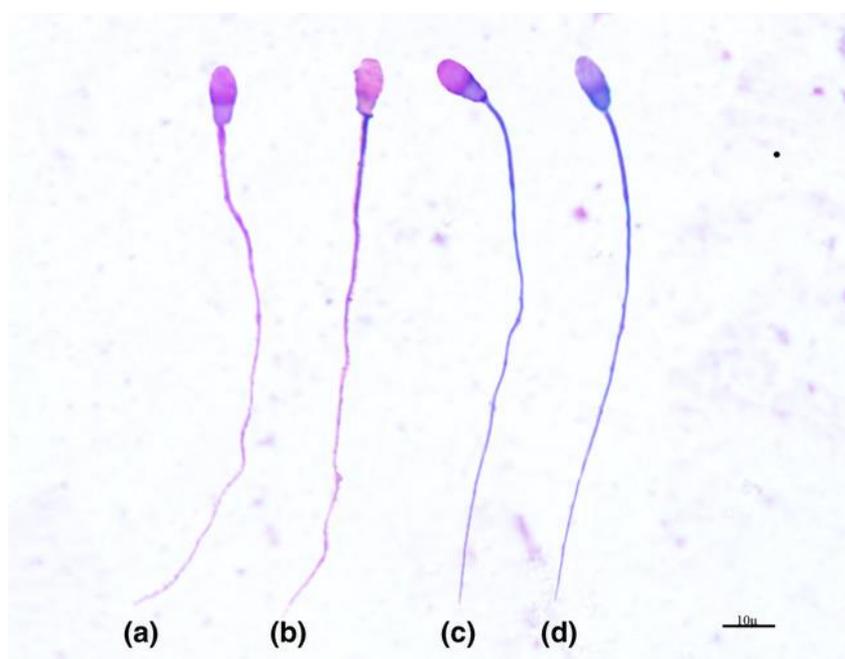


Figura 10. Diferentes categorias de classificação de espermatozoides corados com azul de tripano/Giemsa: (a) espermatozoide morto, com acrossomo lesado; (b) espermatozoide vivo, com acrossomo intacto; (c) espermatozoide morto, com acrossomo intacto; (d) espermatozoide morto, com acrossomo lesado. Fonte: Serafini *et al.* (2013).

4.6 Análise estatística

Os dados de motilidade (M), vigor de motilidade (V), *status* do acrossomo (NCA, CA, RA) e viabilidade (mortos, vivos) foram avaliados pelo teste de normalidade de Anderson Darling, para serem então avaliados por análise de variância (ANOVA) e por fatorial pelo *General Linear Model* do Minitab (Minitab, EUA), utilizando como fatores o diluente (CG, LD, TG), a diluição (100×10^6 , $1 \times$

10⁹), a condição de aerobiose (A, NA) e o tempo (T0, T24, T48, T72 para M/V, e T0 e T72 para *status* do acrossomo e viabilidade), com comparações pareadas, quando necessário, pelo Teste de Tukey, para $P < 0,05$. Os dados de proporção de espermatozoides vivos e mortos, e de capacitados (CA), não capacitados (NCA) e com acrossomo reagido (RA) também foram comparados pelo Teste do Chi Quadrado, para $P < 0,05$. Os resultados também foram comparados pelo teste de correlação simples de Pearson, para $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

Os valores médios das características macro e microscópicas do sêmen ovino fresco, obtido ao longo de três dias de coleta, são apresentados na Tabela 1. As características macroscópicas de cor e aspecto, e físico-química de odor mantiveram-se constantes, com os padrões branco marfim, cremoso e inodoro observados em todos os ejaculados. A média dos defeitos espermáticos individuais na análise da morfologia espermática são apresentados no Anexo 4.

Tabela 1. Características macroscópicas e microscópicas do sêmen ovino fresco, após a coleta de dois ejaculados por dia de coleta, em três dias de coleta, a partir de dois carneiros (média \pm erro padrão médio e variação)

Características do ejaculado ovino fresco	Média \pm erro padrão médio	Máximo	Mínimo
Macroscópicas			
Volume (mL)	1,06 \pm 0,61	2,8	0,3
Movimento de Massa (1-5)	3,90 \pm 0,32	4,5	3,5
Microscópicas			
Turbilhonamento (1-5)	3,76 \pm 0,72	5,0	3,0
Motilidade espermática (%)	71,0 \pm 10,1	90,0	50,0
Vigor de motilidade (1-5)	4,00 \pm 0,57	5,0	3,0
Concentração espermática (células x 10 ⁹ /mL)	3,95 \pm 1,50	7,2	1,8
Total de formas anormais (%)	23,0 \pm 16,9	49,5	7,5
Defeitos maiores (%)	11,3 \pm 7,4	19,5	2,5
Defeitos menores (%)	11,7 \pm 11,8	33,0	2,5

As médias do *status* de capacitação espermática dos ejaculados frescos coletados dos carneiros, caracterizados como a proporção (%) de espermatozoides não capacitados (NCA), capacitados (CA) e com acrossomo reagido (RA), foram de 74,5 \pm 14,3, 15,7 \pm 7,7 e 9,8 \pm 8,5, respectivamente. Estes ejaculados apresentaram uma média de 69,5 \pm 9,6 células vivas, tendo 30,5 \pm 9,6 de células mortas.

5.1 Motilidade espermática e vigor de motilidade do sêmen ovino fresco e refrigerado ao longo do tempo após a diluição

Não houve alteração nos padrões de motilidade espermática (M) e vigor de motilidade (V) do sêmen ovino após a diluição, antes do resfriamento, em comparação ao sêmen fresco. Já após o resfriamento, a motilidade espermática e o vigor de motilidade diminuíram ($P < 0,05$) ao longo do tempo em todos os diluentes (Figura 11). De 48 h até 72 h de refrigeração, houve uma queda significativa na motilidade dos espermatozoides, com as quedas mais significativas ocorrendo quando utilizado o diluente citrato-gema (Figura 11a). Observamos também uma queda significativa ($P < 0,05$) no vigor de motilidade dos espermatozoides ovinos submetidos aos diluentes citrato-gema e leite-em-pó, havendo uma queda brusca no vigor após as 24 h de refrigeração principalmente no diluente citrato-gema (Figura 11a). Já a M/V sob distintas condições de diluição e de aerobiose foram semelhantes entre si ao longo do tempo, com a motilidade e o vigor sofrendo queda mais significativa a partir de 48 e 24 h de resfriamento, respectivamente (Figura 11b, c).

Os efeitos das interações entre distintos diluentes e diluições, diluentes e aerobiose e diluições e aerobiose sobre a motilidade e vigor espermáticos de sêmen ovino diluído e refrigerado a 5°C por até 72 h são apresentados nas Figuras 12 e 13. Não houve diferença na M/V entre grupos, independente da interação. A condição de semi-aerobiose na diluição de 1×10^9 /mL (B, de bilhão) resultou em menor motilidade espermática ao longo do tempo, não havendo diferenças nas demais condições, independente da interação (diluidor, diluente, aerobiose; Figuras 12a, b, c, painéis da direita). Já o vigor de motilidade sofreu efeito negativo ao longo do tempo, dentro de cada grupo (Figuras 12a, b, c, painéis da direita). O sêmen diluído em citrato-gema em ambas as diluições e em ambas as condições de aerobiose apresentaram uma maior queda de vigor ao longo do tempo, já perceptível em 48 h, com o sêmen em Tris-gema apresentando o melhor desempenho ao longo do tempo (Figura 12). O vigor de motilidade em diluente Tris-gema, e em especial na diluição de 100×10^6 /mL (M, de milhão), e independente da condição de aerobiose, manteve-se mais elevado do que os demais diluentes, em especial em comparação ao citrato-gema (Figura 13a, b). O uso do leite desnatado mostrou resultados intermediários de M/V, mas mais semelhantes ao diluente Tris-gema. Não houve diferenças quanto à

diluição e condições de aerobiose em função do tempo de armazenamento (Figuras 12c e 13c).

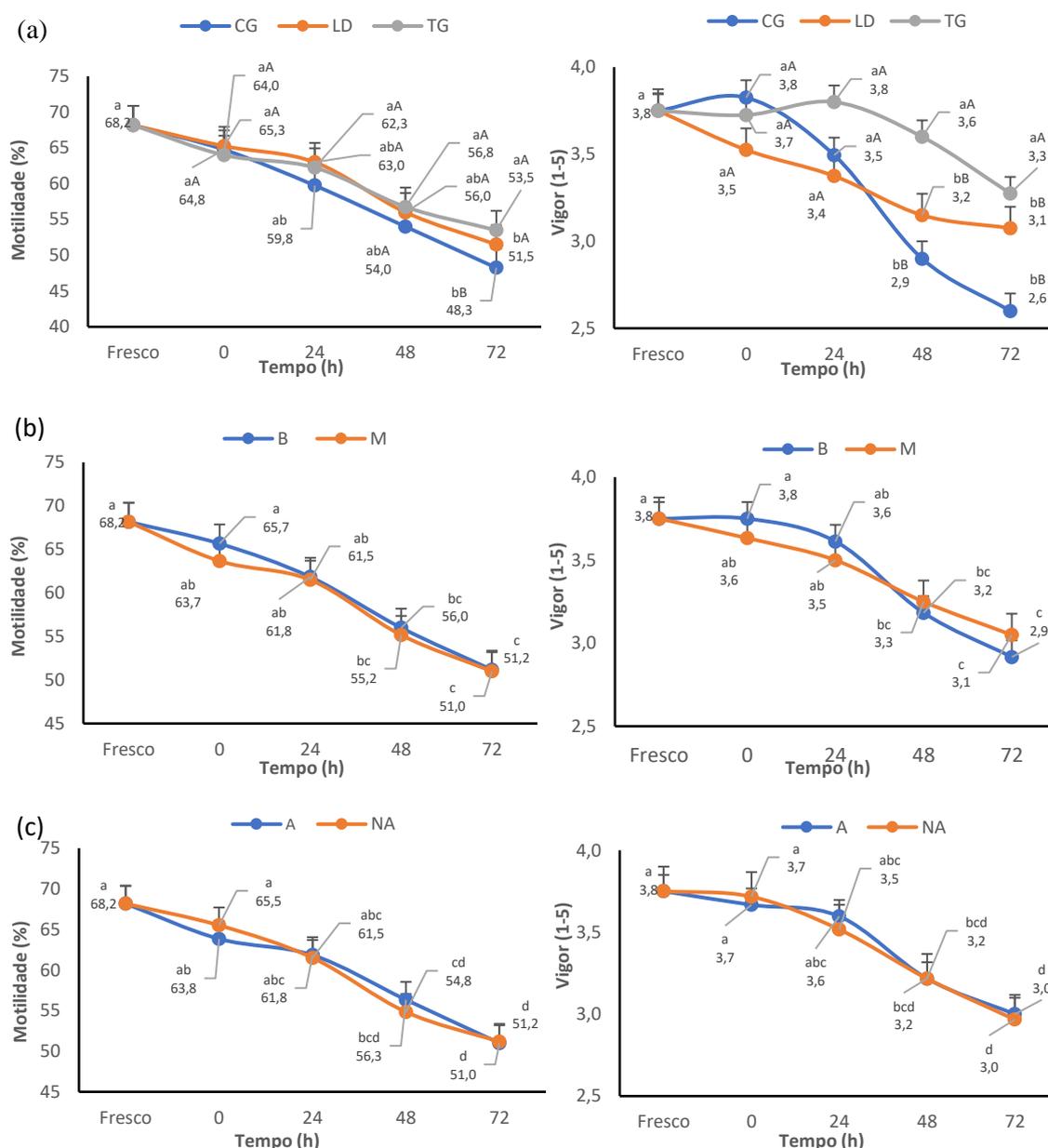


Figura 11. Efeitos do tempo de armazenamento desde a coleta sobre a motilidade (painéis da esquerda, em %) e vigor (painéis da direita, de 1 a 5) espermáticos de sêmen ovino diluído e refrigerado a 5°C por 72 h em distintos (a) diluentes, (b) diluições, e (c) condições de aerobiose. CG: citrato-gema. LD: leite desnatado. TG: tris-gema. B: diluição de 1×10^9 spz/mL. M: diluição de 100×10^6 spz/mL. A: aerobiose. NA: semi-aerobiose. *a,b,c,d*: $P < 0,05$, dentro de cada grupo. *A,B*: $P < 0,05$, entre grupos.

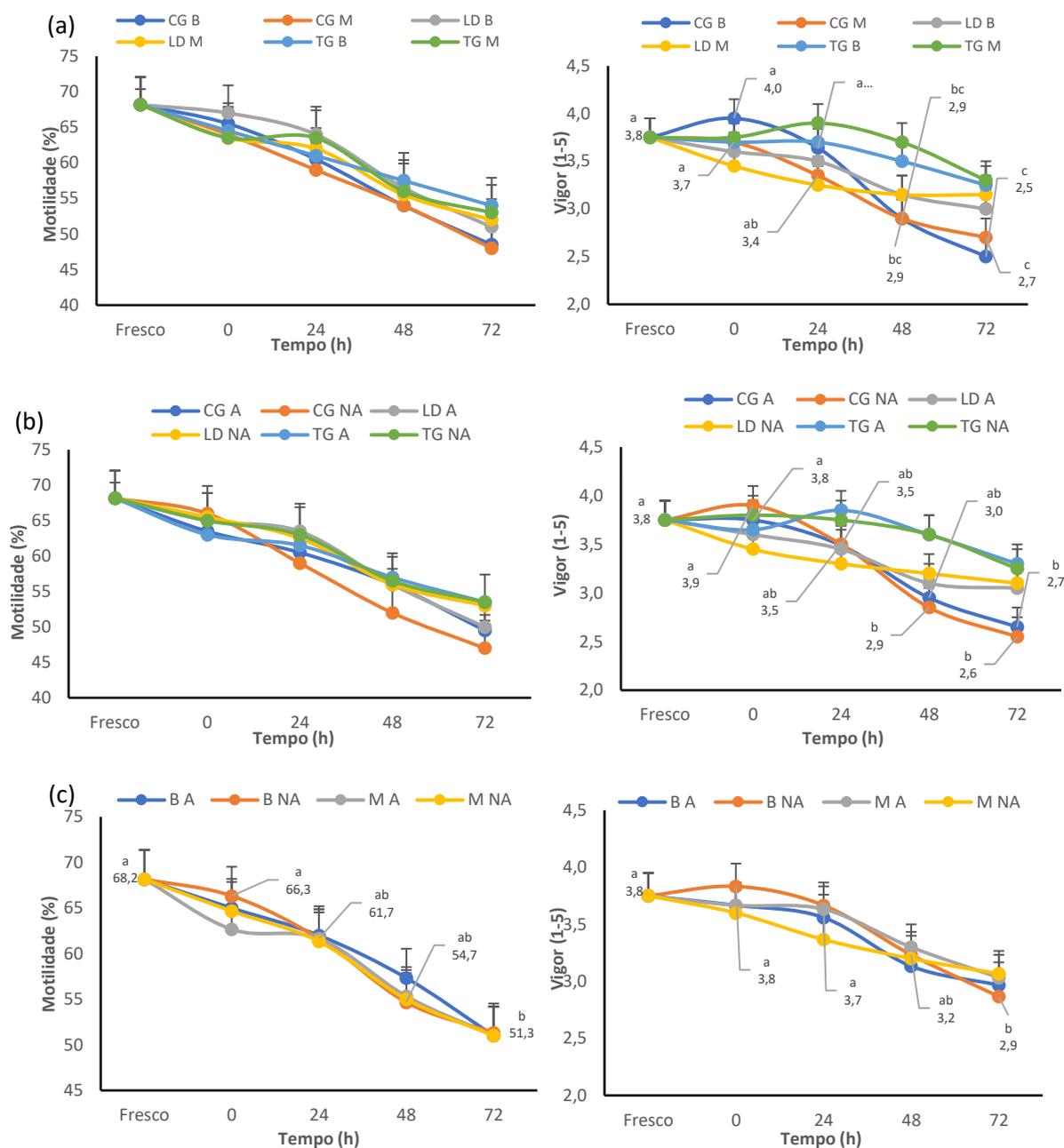


Figura 12. Efeitos do tempo de armazenamento na motilidade (painéis da esquerda, em %) e vigor (painéis da direita, de 1 a 5) espermáticos de sêmen ovino diluído e refrigerado a 5°C por 72 h em distintos diluentes vs. diluições (a), diluições vs. aerobiose (b) e diluições vs. aerobiose (c). CG: citrato-gema. LD: leite desnatado. TG: tris-gema. B: diluição de 1×10^9 /mL. M: diluição de 100×10^6 /mL. A: aerobiose. NA: semi-aerobiose. ^{a,b,c}: $P < 0,05$, dentro de cada grupo.

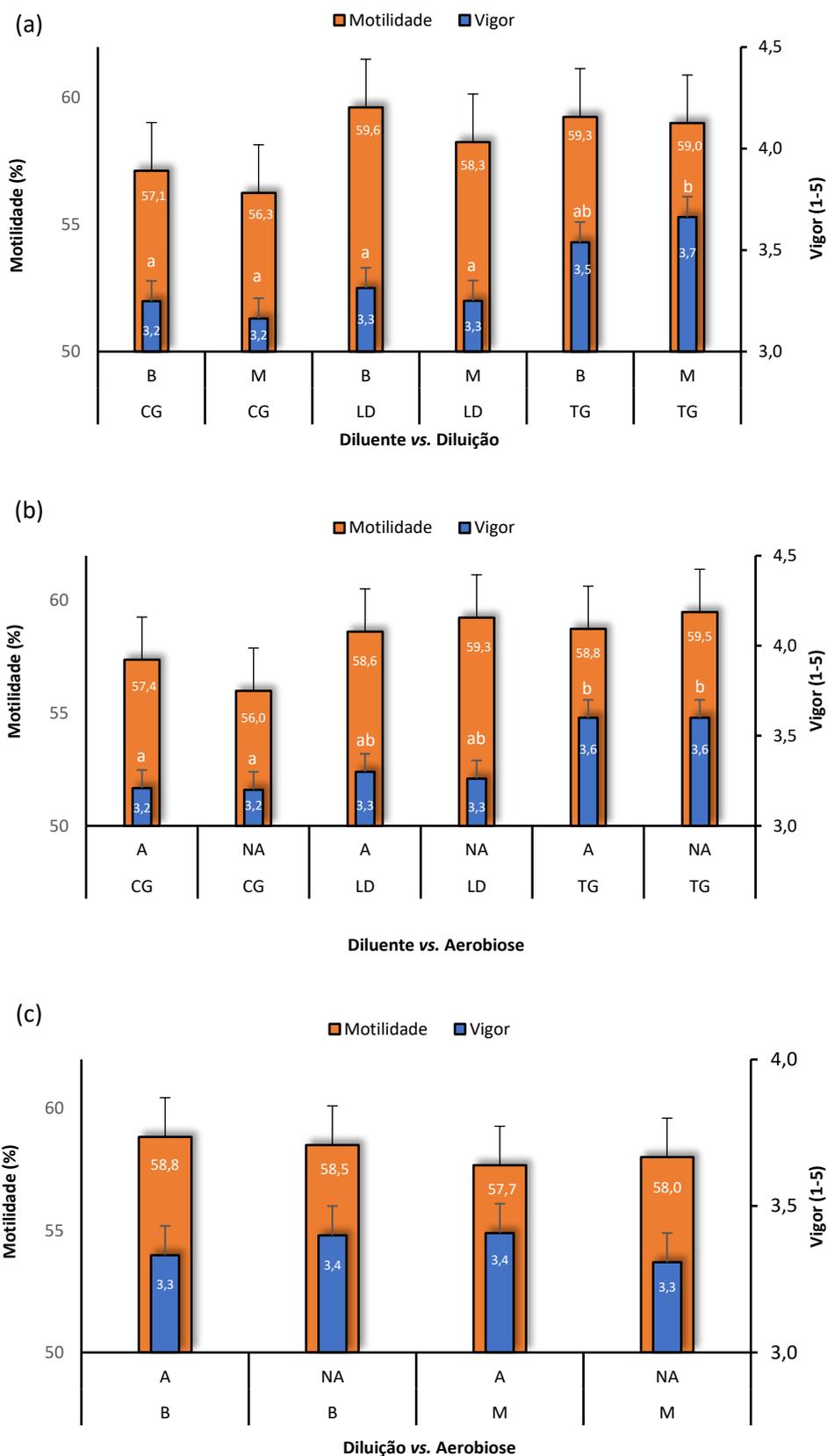


Figura 13. Efeitos do diluente e diluição (a), diluente e aerobiose (b) e diluição e aerobiose (c) na motilidade (%) e vigor (1 a 5) espermáticos de sêmen ovino diluído e refrigerado a 5°C por 72 h. CG: citrato-gema. LD: leite desnatado. TG: tris-gema. B: diluição de 1×10^9 /mL. M: diluição de 100×10^6 /mL. A: aerobiose. NA: semi-aerobiose. ^{a,b}: $P < 0,05$.

5.2 Evolução da taxa de capacitação espermática e de reação acrossomal do sêmen ovino fresco e refrigerado ao longo do tempo após a diluição

As taxas de capacitação espermática e de reação acrossomal do sêmen ovino fresco e refrigerado ao longo do tempo após a diluição em distintos diluentes, fatores de diluição e condições de aerobiose são apresentadas na Figura 14 abaixo. Não houve diferença na proporção de células não capacitadas, capacitadas e com RA no sêmen diluído nos três diluentes (Figura 14a) ou nos dois diferentes fatores de diluição (Figura 14b), independentemente do tempo de armazenamento a 5°C. Já a condição de semi-anaerobiose manteve uma proporção maior de espermatozoide no estado não capacitado e menor no estado de RA, em comparação à aerobiose, independentemente do tempo de armazenamento a 5°C, com a mesma proporção de células capacitadas (Figura 14c). Da mesma forma, o tempo de armazenamento a 5°C diminuiu o número de células não capacitadas, com o aumento de células capacitadas e com RA (Figura 14d).

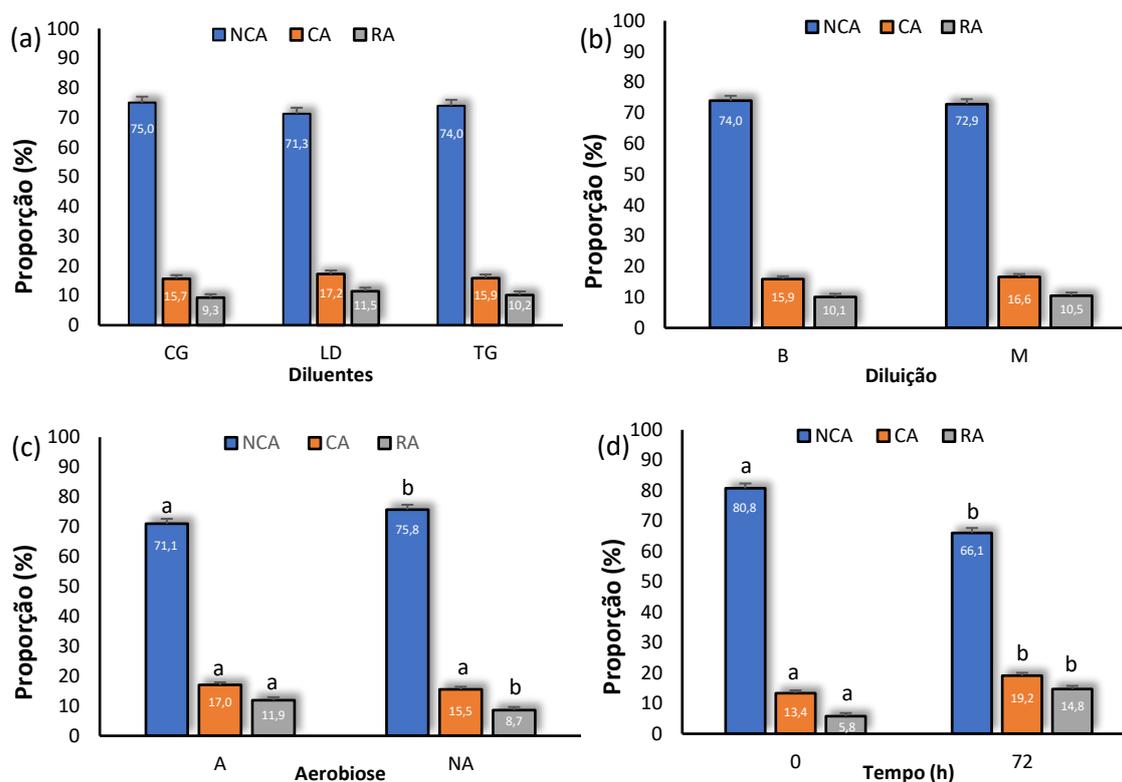


Figura 14. Efeitos do diluente (a), diluição (b), aerobiose (c) e tempo de armazenamento (d) na proporção (%) de espermatozoides não capacitados (NCA), capacitados (CA) e com reação acrossomal (RA) em sêmen ovino diluído e refrigerado a 5°C por 72 h. CG: citrato-gema. LD: leite desnatado. TG: tris-gema. B: diluição de 1×10^9 /mL. M: diluição de 100×10^6 /mL. A: aerobiose. NA: semi-aerobiose. ^{a,b}: $P < 0,05$.

As taxas de sobrevivência espermática e de capacitação e reação acrossomal de sêmen ovino submetido à diluição e refrigeração em distintos diluentes por 72 h são apresentadas na Figura 15 abaixo. Houve ligeiro aumento na mortalidade espermática após a diluição e refrigeração por até 72 h, em comparação com o sêmen fresco, com uma diferença significativa sendo observada no sêmen diluído em citrato-gema, e após 72 h de refrigeração. A proporção de espermatozoides não capacitados reduziu significativamente após a diluição, independente do diluente, sendo semelhante entre diluentes dentro dos tempos 0 h e 72 h. A redução nos espermatozoides não capacitados foi mais significativa no sêmen diluído em leite em pó desnatado após 72 h de armazenamento, em comparação ao tempo 0 h. Já a proporção de espermatozoides capacitados ou com reação acrossomal foi maior no grupo do sêmen diluído em Tris-gema no tempo 0 h em relação ao sêmen fresco. Às 72 h, houve uma maior proporção de capacitação e reação acrossomal em todos os grupos em comparação ao sêmen fresco, sendo também mais elevadas nos grupos com leite desnatado em pó e com Tris-gema. Tais observações corroboram com a associação entre as variáveis de sobrevivência, *M/V*, e *status* do acrossomo. Em geral, houve correlações positivas entre motilidade espermática e o vigor de motilidade ($R=0,778$, $P<0,001$), e entre a proporção de espermatozoides não capacitados e a motilidade espermática ($R=0,538$, $P<0,001$) e o vigor de motilidade ($R=0,528$, $P<0,001$). Também houve uma correlação positiva entre a proporção de espermatozoides capacitados e os com RA ($R=0,526$, $P<0,001$). Já ambas as características (CA e RA) apresentaram uma correlação negativa com a motilidade espermática ($R=-0,537$, $P<0,001$; $R=-0,413$, $P<0,001$), com o vigor de motilidade espermática ($R=-0,520$, $P<0,001$; $R=-0,412$, $P<0,001$), e com espermatozoides não capacitados ($R=-0,856$, $P<0,001$; $R=-0,890$, $P<0,001$), respectivamente.

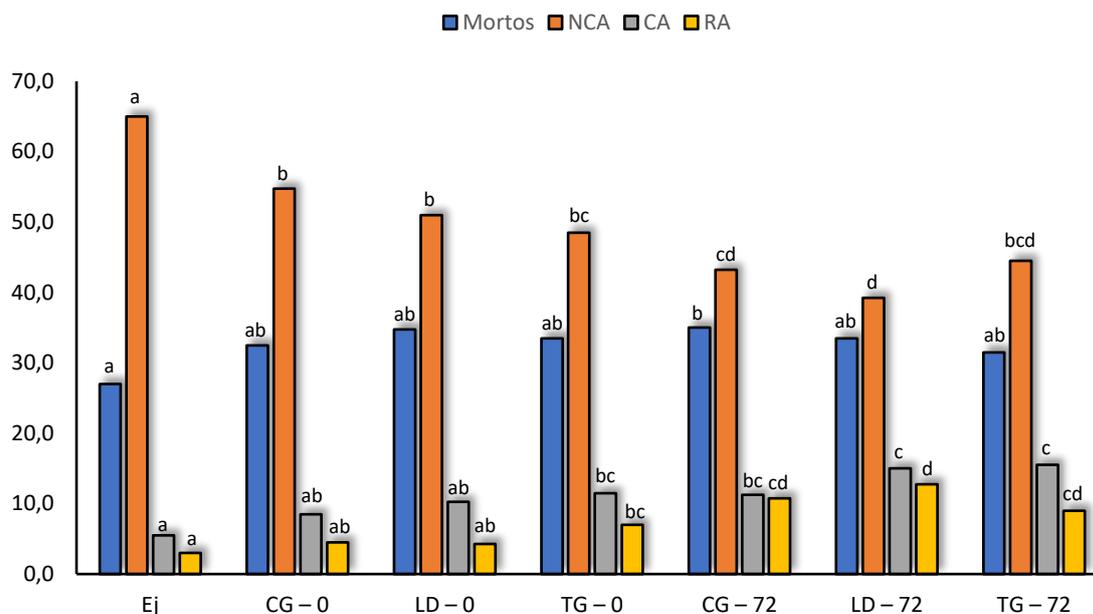


Figura 15. Taxa (%) de viabilidade, capacitação espermática, e reação acrossomal de sêmen ovino fresco após a coleta (Ej) e após a diluição e refrigeração em distintos diluentes (CG, LD, TG) ao longo do tempo (T0 e T72). Ej: Ejaculado. CG: citrato-gema. LD: leite desnatado. TG: tris-gema. T0: tempo 0, de estabilidade a 5°C. T72: 72 h após a estabilização a 5°C. ^{a,b,c,d}: P<0,05, dentro de cada coluna de mesma cor.

As taxas de sobrevivência espermática e de capacitação e reação acrossomal de sêmen ovino submetido à duas distintas taxas de diluição seguida da refrigeração por 72 h são apresentadas na Figura 16. Houve uma maior mortalidade celular na maior diluição (M) após 72 h de refrigeração em comparação aos demais grupos, o que significa que o fator diluição não comprometeu a sobrevivência após a refrigeração no t = 0 h, mas a menor diluição (B) conferiu um fator favorável à sobrevivência quando em armazenamento até 72 h/5°C. Entretanto, houve redução significativa do estado não capacitado com a diluição, independente do fator, já no tempo 0 h, sendo ainda mais perceptível às 72 h. Tal característica está associada ao aumento na proporção de espermatozoides capacitados e com reação acrossomal, notório no tempo 0 h na maior diluição com respeito à capacitação, e para ambas as características às 72 h, em comparação ao sêmen fresco. As correlações entre estas características já foram apresentadas acima.

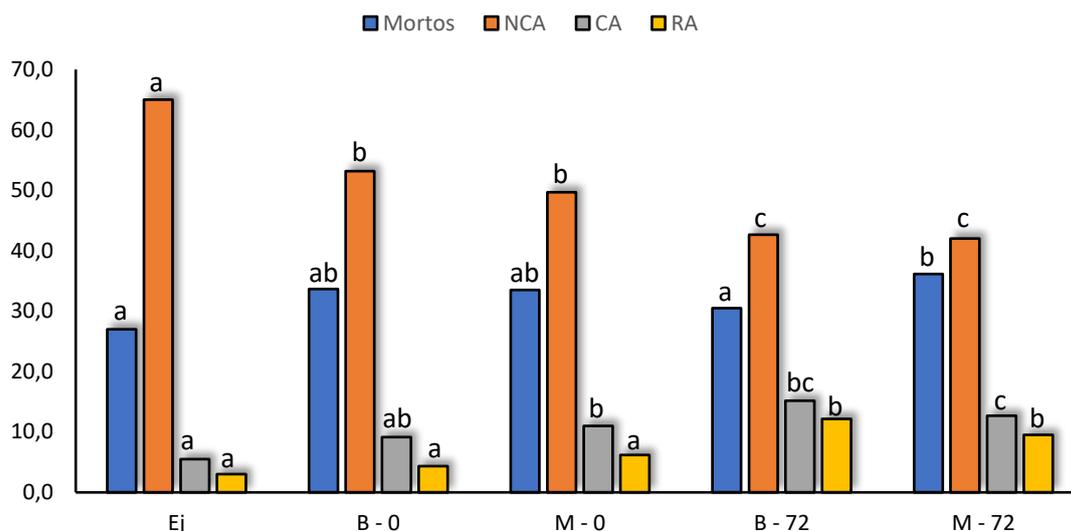


Figura 16. Taxa (%) de espermatozoides mortos, não capacitados (NCA), capacitados (CA) e com reação acrossomal (RA) comparando duas diferentes diluições em distintos tempos de armazenamento (Ej, T0 e T72). Ej: Ejaculado. B: diluição de 1×10^9 spz/mL. M: diluição de 100×10^6 spz/mL. ^{a,b,c,d}: $P < 0,05$, dentro de cada coluna de mesma cor.

Quando comparadas às condições de aerobiose (Figura 17), houve uma maior mortalidade no sistema aeróbico no tempo 0 h, e no sistema semi-anaeróbico após 72 h de armazenamento. A redução na proporção de espermatozoides não capacitados foi mais intensa no sistema aeróbico após 72 h. No $t = 0$ h, não houve diferença na proporção de células com RA entre grupos e com o sêmen fresco. Porém, houve uma maior taxa de capacitação espermática no grupo aeróbico, com o sistema semi-anaeróbico sendo semelhante ao sêmen fresco. Já no $t = 72$ h, houve um aumento significativo de células capacitadas e com RA no grupo em aerobiose em relação aos demais grupos (fresco e $t = 0$ h), com o sistema semi-aeróbico apresentando valores semelhantes aos grupos no $t = 0$ h, mas com maiores taxas de capacitação e de RA em relação ao sêmen fresco.

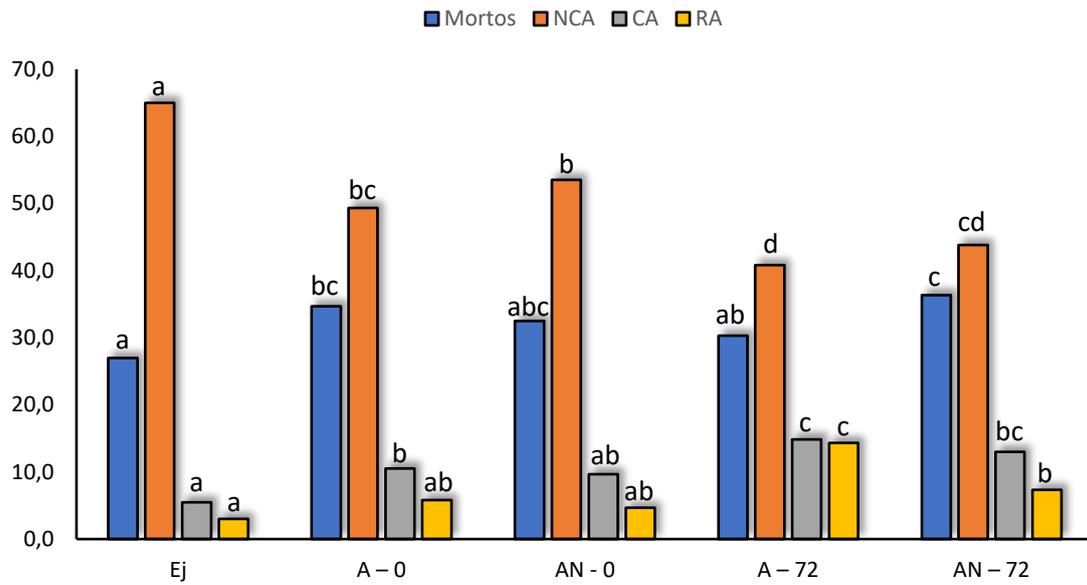


Figura 17. Taxa (%) de espermatozoides mortos, não capacitados (NCA), capacitados (CA) e com reação acrossomal (RA) comparando *status* de aerobiose em diferentes tempos de refrigeração (Ej, T0 e T72). Ej: Ejaculado. A: aerobiose. NA: semi-anaerobiose. ^{a,b,c,d} P<0,05, dentro de cada coluna de mesma cor.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, todas as avaliações dos parâmetros de motilidade espermática (M), vigor de motilidade (V) e do *status* do acrossomo (NCA, CA, RA) foram realizadas de forma subjetiva, mas demonstraram alta repetitividade. Tais procedimentos ainda são amplamente utilizados na prática laboratorial pela praticidade, baixo custo e repetitividade, se executado por operador experiente e treinado, facilitando assim a comparação de resultados com outros trabalhos (ILJENKAITE *et al.*, 2020; OKANO *et al.*, 2019; CRESPILO *et al.*, 2014; KULAKSIZ *et al.*, 2012). Em adição, a avaliação da M/V serviu de parâmetro secundário para a avaliação de associações com as características de mudanças no acrossomo ao longo do tempo, em função da diluição do sêmen *per se*, do fator de diluição e do tipo de diluente do sêmen, além das características de aerobiose, condição conhecidamente associada ao processo bioquímico da capacitação espermática e de reação acrossomal (JIMENEZ *et al.*, 2012; RODRÍGUEZ-ALMEIDA *et al.*, 2008; YANAGIMACHI, 1970).

Houve variação na manutenção da motilidade e vigor de motilidade ao longo do tempo, dependendo do diluente utilizado. Muito embora não tenha havido uma diferença significativa quanto a queda da M/V ao longo do tempo, houve uma redução dos valores médios e que podem estar associados ao potencial choque térmico nos espermatozoides ovinos na refrigeração. A suscetibilidade dos espermatozoides ao choque térmico está ligada a uma alta proporção de ácidos graxos insaturados:saturados nos fosfolipídios de membrana e a um baixo teor de colesterol, o que torna a membrana espermática menos estável (WHITE, 1993). Em ovinos, quando os espermatozoides são resfriados até próximo do ponto de congelamento, a motilidade e a atividade metabólica são irreversivelmente deprimidas e as membranas do acrossomo e plasmática são rompidas (BAILEY *et al.*, 2000; PURDY, 2006; WHITE, 1993). Os fosfolipídios presentes na gema de ovo, quando os diluentes são a base deste composto, protegem a membrana espermática restaurando os fosfolipídios perdidos durante o choque térmico, causado pela mudança de temperatura durante o resfriamento do sêmen (HAMMERSTEDT *et al.*, 1990; PURDY, 2006). Durante um potencial choque térmico, as lipoproteínas da gema interagem com a estrutura lipídica da membrana plasmática do espermatozoide, propiciando a proteção de membrana (CASTELO *et al.*, 2008). Este mecanismo de proteção

para os espermatozoides resfriados encontrado na gema de ovo, é o mesmo princípio quando os diluentes são a base de leite. Neste caso as micelas de caseína isoladas do leite podem proteger os espermatozoides durante o armazenamento a 4-5°C (BERGERON; MANJUNATH, 2006; LEBOEUF et al., 2003; O'SHEA; WALES, 1966).

Em nosso estudo, os resultados indicaram que o diluente a base de Tris preservou a M e o V espermáticos de forma mais significativa do que os diluentes à base de leite e, principalmente, o à base de citrato de sódio. Contrário a estes resultados, no entanto, Lopez-Saez *et al.* (2000) e Kulaksiz *et al.* (2011) relataram melhores taxas de motilidade em espermatozoides utilizando diluentes à base de leite desnatado. O leite possui capacidade de tamponamento devido a sua fração proteica, possuindo também ação bactericida, viscosidade adequada para manutenção dos espermatozoides no meio líquido, e abundância de carboidratos que seriam utilizados pelos espermatozoides na produção de energia (CUNHA, 2002; UBAH *et al.*, 2019). Por fim, a lactose contida nos diluentes a base de leite pode agir como substrato energético, se clivada em glicose e galactose, com a caseína sendo uma substância capaz de potencializar a atividade cinética dos espermatozoides (CUNHA, 2002). É importante ressaltar que a energia para os espermatozoides origina de substratos que sejam facilmente metabolizáveis e tanto o leite quanto a gema-de-ovo fornecem essa energia para o metabolismo dos espermatozoides (MAXWELL; SALAMON, 1993).

Neste estudo, não houve diferença na M e V entre grupos experimentais, independente da interação entre diluente, fator de diluição, ou condição de aerobiose. Curiosamente, o sêmen fresco apresentou uma proporção de cerca de 25% de espermatozoides apresentando padrões de CA ou de RA, ou seja, 75% dos espermatozoides se apresentaram como não capacitados após a coleta. As correlações observadas entre os resultados de motilidade, vigor, e *status* da capacitação e com RA demonstraram que quanto maior a proporção de espermatozoides não capacitados, e menor a de capacitados e/ou com acrossomo reagido, maior a motilidade espermática e melhor o vigor de motilidade. Após a diluição, já se percebeu uma perda gradual da M e do V, com a redução também da proporção de espermatozoides NCA, e aumento de espermatozoides CA e com RA. Em outras palavras, com a queda da proporção

de células não capacitadas, e aumento de capacitadas e com RA, houve também uma redução na proporção de espermatozoides vivos. De fato, demonstrou-se em equinos e em humanos que a viabilidade espermática de espermatozoides capacitados é reduzida, havendo uma relação entre a indução de CA em uma amostra e uma menor sobrevivência ao longo do tempo (AITKEN; CLARKSON, 1987; SAMPER *et al.*, 2007; SQUIRES *et al.*, 2003). Tais observações parecem terem sido corroboradas neste estudo.

Mesmo que a diminuição da temperatura cause uma queda significativa no metabolismo dos espermatozoides, reduzindo as taxas de frutólise e o consumo de oxigênio (BLACKSHAW *et al.*, 1957), a qualidade espermática diminui ao longo do período de refrigeração, independentemente do diluente, da taxa de diluição ou das condições de armazenamento (O'HARA *et al.*, 2010). Além disso, sabemos que o espermatozoide é uma célula aeróbica, a qual utiliza oxigênio em seu metabolismo, produzindo, em condições fisiológicas, níveis basais de moléculas de EROs, as quais são essenciais em diversos processos envolvidos na capacitação e na hiperativação espermáticas, reação acrossomal e interação entre o espermatozoide-oócito (BURNAUGH *et al.*, 2007; LAMIRANDE *et al.*, 1997). Assim, durante o processo de capacitação espermática, há um aumento nos níveis de cálcio intracelular, EROs e da tirosina quinase, promovendo uma maior produção da adenosina monofosfato cíclica (AMPC), culminando em um estado de hiperativação e, por fim, na reação acrossômica fisiológica, pela aquisição do *status* que permita a fecundação (AITKEN; BAKER, 1995; LAMIRANDE *et al.*, 1997; SAALU, 2010). Portanto, em condições com elevadas concentrações de EROs, a qualidade e sobrevivência espermáticas são comprometidas, em especial nas espécies ovina e equina, as quais são as espécies que mais produzem EROs intracelulares, causando danos na cromatina, membranas e proteínas dos espermatozoides (BALL, 2008; BRUMMER *et al.*, 2013; LAMIRANDE *et al.*, 1997; MATA-CAMPUZANO *et al.*, 2012; VALENÇA; GUERRA, 2007). A condição de semi-aerobiose na maior diluição (M, 100×10^6 células/mL), neste estudo, resultou em M ao longo do tempo. Por outro lado, resultou em maior proporção de espermatozoides NCA e menor com RA, o que o esperado, potencialmente devido à privação de oxigênio e à não geração suficiente de EROs para os processos de capacitação e reação. Além disto, Samo *et al.* (2006) relataram que a privação de oxigênio dos

espermatozoides estava diretamente relacionada com a motilidade espermática, pois ao colocá-los em condições anaeróbicas, houve uma redução nas taxas de motilidade ao longo do tempo de incubação de 5 h. Nisso, o primeiro fator da menor motilidade espermática observada no grupo de maior concentração neste estudo (B, 1×10^9 células/mL) foi a privação de oxigênio disponível para os espermatozoides, com o segundo fator podendo estar relacionado ao elevado número de células, que possivelmente consomem o oxigênio presente no meio.

Neste estudo, a proporção de espermatozoides NCA diminuiu significativamente de 0 h a 72 h em todos os grupos. Observou-se um aumento na mortalidade celular e na proporção de espermatozoides CA e com RA, com a redução de NCA e aumento de CA e RA sendo menos intenso quando na condição semi-anaeróbica, a qual paradoxalmente, possuía uma maior taxa de mortalidade às 72 h. A queda mais significativa na proporção de células NCA ocorreu nas amostras em aerobiose após 72 h de refrigeração, a qual esteve relacionada a uma maior taxa de CA e com RA nas células em aerobiose, com um aumento significativo de células mortas e com menor capacitação e reação acrossômica na condição semi-anaeróbica. Tal condição parece estar relacionada à mortalidade precoce das células espermáticas, podendo ser causada pela privação de oxigênio e o aumento de espécies reativas no meio extracelular, advindo do extravasamento das células mortas, e assim estar levando a uma toxicidade e prejudicando a viabilidade das células (ALBERTS *et al.*, 2015). O papel da oxidação como fonte de energia para a motilidade dos espermatozoides pode ser considerado mínimo quando há presença de glicose como substrato para glicólise (MAKLER *et al.*, 1992). Já na condição aeróbica, houve uma maior proporção de espermatozoides CA, em comparação à condição semi-anaeróbica, o que foi aumentado no maior fator de diluição (M, 100×10^6 /mL), aspecto potencialmente associado a uma maior diluição dos fatores descapacitantes do plasma seminal e da menor capacidade de proteção e estabilização de membrana dos distintos diluentes utilizados neste estudo. Isto corrobora com o trabalho de Perez-Pé *et al.* (2001), os quais demonstraram que nos ovinos o plasma seminal possui propriedades descapacitantes que previnem a fosforilação da tirosina, que está relacionada à capacitação. Como a sobrevivência de espermatozoides capacitados e com acrossomo reagido é menor (MEDEIROS *et al.*, 2002), percebe-se um aumento na proporção de

espermatozoides CA e com RA ao longo do tempo, com a concomitante queda na M e V espermáticos. Com base nos resultados acima, pode-se inferir que as amostras em sistema de aerobiose podem ter sofrido uma maior capacitação e RA com o passar do tempo, pela presença de maior concentração de EROs, enquanto o sistema semi-anaeróbico aparentou ter sido mais citotóxico, causando maior mortalidade. Um aumento de EROs no meio poderia induzir peroxidação lipídica que, por sua vez, alteraria características da membrana que são críticas para a manutenção da função do espermatozoide (AITKEN, 2017).

Observamos uma maior mortalidade celular na maior diluição (M) após 72 h de refrigeração em comparação aos demais grupos, o que significa que o fator diluição não comprometeu a sobrevivência após a refrigeração no $t = 0$ h, mas o menor fator de diluição (B) proporcionou condições mais favoráveis à sobrevivência quando em armazenamento até 72 h a 5°C. Possivelmente, a menor diluição permitiu a proteção à membrana acrossômica pelos componentes do plasma seminal e fatores descapacitantes, que ainda se apresentavam em quantidades equimolares biologicamente ativas (ANDRADE, 2009; MAKLER *et al.*, 1992). A redução nestes fatores e componentes do plasma seminal com a diluição, independente do fator, levou à redução significativa de células NCA já no tempo 0 h, sendo ainda mais perceptível às 72 h. Tal característica está associada ao aumento na proporção de espermatozoides CA e com RA, notório no tempo 0 h na maior diluição com respeito à capacitação, e para ambas as características às 72 h, em comparação ao sêmen fresco. Isto corrobora com o fato de que, na espécie ovina, a maior diluição do plasma seminal, e conseqüente maior diluição das proteínas, possui ação capacitante, pela maior desestabilização e restauração da membrana de espermatozoides intactos ou danificados (BARRIOS *et al.*, 2005).

Percebe-se neste experimento que os fatores de variação positiva ou negativa sobre a M e V foram o diluente utilizado e o tempo de armazenamento a 5°C, enquanto o *status* do acrossomo e de sobrevivência espermática esteve mais associada, embora em grau mais tênue, prioritariamente à condição de aerobiose e fator de diluição, com o diluente apresentando menor impacto em função do tempo. Com base nas observações de M, V e *status* do acrossomo ao longo do tempo, pode-se inferir que o diluente citrato-gema, em especial a solução tamponante/isosmótica de citrato de sódio, não foi eficiente para a

manutenção da M e V por períodos mais prolongados (acima de 24 h), com o diluente a base de Tris-gema demonstrando maior capacidade de manutenção da M e V em refrigeração pelo período de armazenamento deste estudo (72 h), apesar de consideramos mais efetivo até no máximo 48 h. Houve uma redução de espermatozoides NCA e elevação de células CA e com RA em todos os diluentes até as 72 h de armazenamento, em especial no diluente a base de leite. Porém, houve uma maior proporção de células CA e RA após a diluição em Tris-gema, no tempo 0 h. Desta forma, dentro de nossas observações, o citrato-gema é um diluente que se mostrou apropriado para uso mais imediato após a diluição e refrigeração, com indicação para uso mais imediato na IA. Já o diluente à base de leite demonstrou propriedades adequadas para a refrigeração por até 24 h, podendo ser de interesse para a coleta, diluição, refrigeração e transporte para uso na IA no dia seguinte à coleta. Por fim, o diluente Tris-gema foi permissivo ao armazenamento por até 48 h, corroborando com diversos relatos da literatura (ANEL *et al.*, 2006; LÓPEZ-SÁEZ *et al.*, 2000; RODRÍGUEZ-ALMEIDA *et al.*, 2008). Não obstante, e sob as condições deste estudo, os diluentes são adequados para a refrigeração por até 72 h, mas maiores estudos são necessários para prolongar este armazenamento por mais de 72 h, e a condição de semi-anaerobiose não apresentou benefícios à conservação do sêmen. Potencialmente, mas não definitivamente conclusivo, o menor fator de diluição parece ser menos negativo à viabilidade e *status* do acrossomo do espermatozoide ovino. Por fim, todas as condições e fatores avaliados estando relacionados a uma diminuição gradual na proporção de espermatozoides não capacitados e na viabilidade espermática do sêmen ovino diluído e refrigerado a 5°C por até 72 h.

7. CONCLUSÕES

Os resultados observados deste estudo nos permitem concluir que:

- (a) A desestabilização do acrossomo associada ao processo de capacitação espermática e reação acrossomal já foi detectada em níveis significativos (25%) logo após a coleta do sêmen ovino;
- (b) Os procedimentos de manipulação do sêmen ovino *in vitro*, incluindo o tipo de diluente, o fator de diluição, o resfriamento e a condição de aerobiose diminuíram a viabilidade espermática e a proporção de espermatozoides não capacitados em função do tempo de armazenamento a 5°C;
- (c) Todas as condições e fatores analisados determinaram alterações graduais no *status* do acrossomo espermático, com redução na proporção de espermatozoides não capacitados e de sobrevivência espermática, respectivamente, após a coleta (75% e 71%), após a diluição e refrigeração a 5°C (73% e 65%) e após 72 h de armazenamento (66% e 51%), com as quedas mais significativas no vigor de motilidade e na motilidade espermáticas ocorrendo a partir de 24 e 48 h de armazenamento a 5°C, respectivamente; e
- (d) A proporção de espermatozoides com capacitação e/ou reação acrossomal aumentou gradativamente após a diluição e armazenamento do sêmen ovino a 5°C, havendo uma correlação negativa com a viabilidade, motilidade e vigor espermáticos em função do tempo.

8. PERSPECTIVAS

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pretende-se futuramente realizar experimentos com um maior número de animais para tentar eliminar o fator animal, assim como otimizar o tempo de manipulação do sêmen desde a coleta até o resfriamento. Deverá ser realizado também o experimento durante a estação reprodutiva dos animais para determinar as diferentes reações na capacitação espermática em diversas estações do ano. Também deveremos aumentar o número de amostras para a análise da capacitação e da reação acrossômica, coletando amostras também nos tempos de 24 e 48 h de refrigeração para determinar quais os tempos estão associados à maior indução de capacitação e da reação acrossomal dos espermatozoides. Em adição, a avaliação da criocapacitação, após a criopreservação do sêmen, também deverá ser avaliada. Por fim, e se possível, a utilização de equipamento computadorizado para a análise do sêmen (*computer-assisted sperm analysis, CASA*) trará maior padronização nos resultados.

Muito se conhece sobre a refrigeração e o congelamento de espermatozoides bovinos, mas ainda temos poucos estudos que visam aumentar o conhecimento dos processos biológicos envolvidos na capacitação e na reação acrossômica de espermatozoides ovinos. Em nosso estudo, houve uma correlação positiva entre a viabilidade e a proporção de células não capacitadas, e negativa destes com a proporção de células capacitadas ou com acrossomo reagido, o que possui um impacto potencial na fertilidade subsequente ao uso do sêmen para a IA, e muito em função do diluente, fator de diluição, e do tempo de armazenamento. Como se sabe que células capacitadas ou após a reação acrossomal possuem menor viabilidade ao longo do tempo, presumimos que a proteção/estabilização da membrana plasmática espermática após a diluição, refrigeração e armazenamento deverá manter uma elevada proporção de espermatozoides não capacitados na amostra, o que poderá se repercutir, por sua vez, em maiores taxas de prenhez após a IA. Estudos nesta área deverão repercutir em melhoria na eficiência da preservação de sêmen ovino e no desenvolvimento de protocolos mais eficientes para a preservação de genética ovina, com o intuito de otimizar a utilização de doses inseminantes e diminuir os custos e manejos reprodutivos para produtores de carne e leite ovino.

9. REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A. *et al.* What an andrologist/ urologist should know about free radicals and why. **Urology**, United States, v. 67, p. 2–8, 2006.
- AGARWAL, A. *et al.* Effect of oxidative stress on male reproduction. **The World Journal of Mens Health**, Korea, v. 32, p. 1–17, 2014.
- AISEN, E. *et al.* Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with threalose-based hypertonic extenders. **Cryobiology**, United States, v. 50, p. 239-249, 2005.
- AITKEN, R. J. The capacitation-apoptosis highway: oxysterols and mammalian sperm function. **Biology of reproduction**, United States, v. 85, p. 9-12, 2011.
- AITKEN, R. J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. **Molecular Reproduction and Development**, United States, v. 84, p. 1039–1052, 2017.
- AITKEN, R. J. *et al.* Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good samaritans? **Human Reproduction**, United Kingdom, v. 10, p. 1736-1736, 1995.
- AITKEN, R. J. *et al.* Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. **Reproduction**, United Kingdom, v. 81, p. 459-469, 1987.
- AITKEN, R. J. *et al.* Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: The balance of benefit and risk. **BioEssays**, United Kingdom, v. 16, p. 259–267, 1994.
- AITKEN, R. J. *et al.* Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, United States, v. 164, p. 542–551, 1991.
- AITKEN, R. J. *et al.* Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**, United Kingdom, v. 122, p. 497-506, 2001.
- AITKEN, R. J. *et al.* Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. **Free Radical Biology and Medicine**, United States, v. 36, p. 994–1010, 2004.

- AL-ESSAWE, E. M. *et al.* Seminal plasma influences the fertilizing potential of cryopreserved stallion sperm. **Theriogenology**, United States, v. 115, p. 99-107, 2018.
- AL-MUTARY, M. G. *et al.* Effect of different concentrations of resveratrol on the quality and in vitro fertilizing ability of ram semen stored at 5°C for up to 168 h. **Theriogenology**, United States, v. 152, p. 139-146, 2020.
- ALBERTS, B. *et al.* **Molecular biology of the cell**. 6th ed. United States: Editora Garland Science 2015. 1465 p.
- ALMEIDA, J. L. **Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen equino**. 2006. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade de Brasília, Brasília, 2006.
- ALVAREZ, J. G. *et al.* Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: glycerol and other polyols as sole cryoprotectant. **Journal of Andrology**, United States, v. 14, p. 199-209, 1993.
- ALVAREZ, M. *et al.* Sperm concentration at freezing affects post-thaw quality and fertility of ram semen. **Theriogenology**, United States, v. 77, p. 1111-1118, 2012.
- AMANN, R. P. *et al.* Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, United States, v. 7, p. 145–173, 1987.
- ANDRADE, A. F. C. **Efeito da adição do plasma seminal nas mudanças semelhantes à capacitação (Criocapacitação) em espermatozoides criopreservados de eqüinos**. 2009. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- ANEL, L. *et al.* Improvement strategies in ovine artificial insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, Germany, v. 41, p. 30–42, 2006.
- ARCELAY, E. *et al.* Assessment of Sperm Function for IVF. **Human Reproduction**, United Kingdom, v. 3, p. 89-95, 2008.
- ARI, U. C. *et al.* Freezability of tushin ram semen extended with goat or cow milk-based extenders. **Reproduction in Domestic Animals**, Germany, v. 46, p. 975-979, 2011.

- AUSTIN, C. R. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. **Australian Journal of Biological Sciences**, Australia, v. 4, p. 581-596, 1951.
- ÁVILA, V. S. D. *et al.* O retorno da ovinocultura ao cenário produtivo do Rio Grande do Sul. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, Brasil, v. 11, p. 2419-2426, 2013.
- AZEVEDO, H. C. **Métodos e técnicas para viabilizar a inseminação artificial transcervical com sêmen congelado em ovinos**. 2002. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)- Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2002.
- BAILEY, J. L. *et al.* Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, United States, v. 21, p. 1-7, 2000.
- BAILEY, J. L. *et al.* Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. **Canadian Journal of Animal Science**, Canada, v. 83, p. 393-401, 2003.
- BALL, B. A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impact of sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, Netherlands, v. 107, p. 257-267, 2008.
- BARRIOS, B. *et al.* Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. **Journal of Andrology**, United States, v. 26, p. 539-549, 2005.
- BARRIOS, B. *et al.* Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **Biology of Reproduction**, United States, v. 63, p. 1531-1537, 2000.
- BENOFF, S. The role of cholesterol during capacitation of human spermatozoa. **Human Reproduction**, United Kingdom, v. 8, p. 2001-2008, 1993.
- BERGERON, A. *et al.* Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. **Biology of Reproduction**, United States, v. 77, p. 120-126, 2007.

- BERGERON, A. *et al.* New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular Reproduction and Development**, United States, v. 73, p. 1338–1344, 2006.
- BISHT, S. *et al.* Oxidative stress and male infertility. **Nature Reviews Urology**, United Kingdom, v. 14, p. 470–485, 2017.
- BITTENCOURT, R.F. *et al.* Avanços na criopreservação do sêmen ovino I: diluidores e crioprotetores. **Ciência Animal Brasileira**, Brasil, v. 14, p. 522-536, 2013.
- BLACKSHAW, A.W. *et al.* Factors influencing metabolic activity of bull spermatozoa. I. 37, 21, and 5° C. **Journal of Dairy Science**, United States, v. 40, p. 1093-1098, 1957.
- BOERKE, A. *et al.* Involvement of bicarbonate-induced radical signaling in oxysterol formation and sterol depletion of capacitating mammalian sperm during in vitro fertilization. **Biology of Reproduction**, United States, v. 88, p. 21-1, 2013.
- BOERKE, A. *et al.* Capacitation-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma membrane: functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosome reaction. **Theriogenology**, United States, v. 70, p. 1188-1196, 2008.
- BRENER, E. *et al.* Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. **Biology of Reproduction**, United States, v. 68, p. 837–45, 2003.
- BROMFIELD, E. G. *et al.* Heat Shock Protein member A2 forms a stable complex with angiotensin converting enzyme and protein disulfide isomerase A6 in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, United Kingdom, v. 22, p. 93-109, 2016.
- BROUWERS, J.F.H.M. *et al.* In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. **Free Radical Biology & Medicine**, United States, v. 35, p. 1382–1391, 2003.
- BRUMMER, M. *et al.* Interrelationships among selenium status, antioxidant capacity and oxidative stress in the horse. **Journal of Equine Veterinary Science**, United States, v. 33, p. 332, 2013. Parte do número especial de: Proceedings of the 2013 Equine Science Society Symposium.

- BUFFONE, M.G. **Sperm acrosome biogenesis and function during fertilization**. United States: Springer International Publishing, 2016.
- BUI, A. D. *et al.* Reactive oxygen species impact on sperm DNA and its role in male infertility. **Andrologia**, Germany, v. 50, [art.] e13012, 2018.
- CÂMARA, D. R. *et al.* Influence of catalase and pre-freezing equilibration on post-thaw semen quality and conception rate in ewes laparoscopically inseminated. **Animal Reproduction**, Brasil, v. 13, p. 21-27, 2018.
- CHANG, M. C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. **Nature**, United Kingdom, v. 168, p. 697-698, 1951.
- CHAKRABARTY, J. *et al.* Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. **Cryobiology**, United States, v. 54, p. 27-35, 2007.
- CHOW, C. K. Vitamin E and oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, United States, v. 11, p. 215-232, 1991.
- CIATTEI, A. P. Micronutrient and reduction of oxidative stress in spermatozoas. **International Journal of Nutrology**, Brasil, v. 9, p. 153-159, 2016.
- COCUZZA, M. *et al.* Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence-based analysis. **International Brazilian Journal of Urology**, Brasil, v. 33, p. 603-621, 2007.
- COLAS, C. *et al.* Cyclic-AMP initiates protein tyrosine phosphorylation independent of cholesterol efflux during ram sperm capacitation. **Reproduction, Fertility and Development**, Australia, v. 20, p. 649–658, 2008.
- CBRA-COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104 p.
- CORMIER, N. *et al.* Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. **Journal of Andrology**, United States, v. 18, p. 461-468, 1997.
- COY, P. *et al.* Roles of the oviduct in mammalian fertilization. **Reproduction**, United Kingdom, v. 144, p. 649-660, 2012.
- CRESPILHO, A. M. *et al.* Sperm fertility and viability following 48 h of refrigeration: Evaluation of different extenders for the preservation of bull

- semen in liquid state. **Animal Reproduction Science**, Netherlands, v. 146, p. 126-133, 2014.
- CROSS, N. L. Multiple effects of seminal plasma on the acrosome reaction of human sperm. **Molecular Reproduction and Development**, United States, v. 35, p. 316-323, 1993.
- CUMMINS, J. M. *et al.* Treating male infertility needs more clinical andrology, not less. **Human Reproduction**, United Kingdom, v. 9, p. 1214-1219, 1994.
- CUNHA, I. C. N. **Criopreservação do sêmen de cães**. 2002. 149 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal)- Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2002.
- CURRY, M. R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. **Reviews of Reproduction**, United Kingdom, v. 5, p. 46-52. 2000.
- D'ALESSANDRO, A. G. *et al.* Post-thaw survival of ram spermatozoa and fertility after insemination as affected by prefreezing sperm concentration and extender composition. **Theriogenology**, United States, v. 55, p. 1159–1170, 2001.
- DARIN-BENNETT, A. *et al.* Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. **Cryobiology**, United States, v. 14, p. 466–470, 1977.
- DED, L. *et al.* Effect of estrogens on boar sperm capacitation in vitro. **Reproductive Biology and Endocrinology**, United Kingdom, v. 8, p. 1-11, 2010.
- DED, L. *et al.* Fluorescent analysis of boar sperm capacitation process in vitro. **Reproductive Biology and Endocrinology**, United Kingdom, v. 17, p. 1-11, 2019.
- DESNOYERS, L. *et al.* Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. **Biological Chemistry**, United States, v. 267, p. 10149–10155, 1992.
- DROBNIS, E. Z. *et al.* Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. **Journal of Experimental Zoology**, United States, v. 265, p. 432-437, 1993.
- DRUART, X. *et al.* In vivo imaging of in situ motility of fresh and liquid stored ram spermatozoa in the ewe genital tract. **Reproduction**, United Kingdom, v. 138, p. 45-53, 2009.

- FALCHI, L. *et al.* Liquid storage of ram semen for 96 h: effects on kinematic parameters, membranes and DNA integrity, and ROS production. **Livestock Science**, Netherlands, v. 207, p. 1-6, 2018.
- FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R. *et al.* Effects of long-term chilled storage of red deer epididymides on DNA integrity and motility of thawed spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, Netherlands, v. 111, p. 93-104, 2009.
- FLESCH, F. M. *et al.* Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. **Journal of Cell Science**, United Kingdom, v. 114, p. 3543-3555, 2001.
- FLESCH, F. M. *et al.* Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes**, Netherlands, v. 1469, p. 197-235, 2000.
- GADEA, J. *et al.* Supplementation of the thawing medium with reduced glutathione improves function of frozen thawed goat spermatozoa. **Reproductive Biology**, Poland, v. 13, p. 24–33, 2013.
- GADELLA, B. M. *et al.* An update on post-ejaculatory remodeling of the sperm surface before mammalian fertilization. **Theriogenology**, United States, v. 85, p. 113-124, 2016.
- GADELLA, B. M. *et al.* Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. **Theriogenology**, United States, v. 81, p. 74–84, 2014.
- GADELLA, B. M. *et al.* Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, Netherlands, v. 68, p. 249-265, 2001.
- GADELLA, B. M. *et al.* Sperm head membrane reorganization during capacitation: possible implications for zona adhesion and the acrosome reaction. **International Journal of Developmental Biology**, Spain, v. 52, p. 473–480, 2008.
- GANGWAR, D. K. *et al.* Signaling events and associated pathways related to the mammalian sperm capacitation. **Reproduction in Domestic Animals**, Germany, v. 50, p. 705-711, 2015.
- GAO, D. *et al.* Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. **Reproductive Tissue Banking**, United States, p. 263-328, 1997.

- GARNER, D. L. *et al.* Espermatozoides e plasma seminal. *In*: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. (ed.). **Reprodução animal**. São Paulo: Editora Manole, 2004. p. 97-110.
- GAVELLA, M. *et al.* Evaluation of ascorbate and urate antioxidant capacity in human semen. **Andrologia**, Germany, v. 29, p. 29-35, 1997.
- GERVASI, M. G. *et al.* Chang's meaning of capacitation: a molecular perspective. **Molecular Reproduction and Development**, United States, v. 83, p. 860-874, 2016.
- GILLAN A. *et al.* Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, Australia, v. 9, p. 481-487, 1997.
- GOMES, R. A. *et al.* Inovações tecnológicas na caprinocultura. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 14, p. 104-120, 2013.
- GRASA, P. *et al.* Signal transduction mechanisms involved in in vitro ram sperm capacitation. **Reproduction**, United Kingdom, v. 132, p. 721-732, 2006.
- GUERRA, M. M. P. *et al.* Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Brasil, v. 28, p. 187-195, 2004.
- GÜNDOĞAN, M. Short term preservation of ram semen with different extenders. **Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**, Turkey, v. 15, p. 429- 435, 2009.
- GÜNDOĞAN, M. Some reproductive parameters and seminal plasma constituents in relation to season in Akkaraman and Awassi Rams. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, Turkey, v. 30, p. 95-100, 2006.
- HAFEZ, E. S. E. *et al.* Reproductive Cycles. *In*: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reproduction in farm animals**. 7th ed. United States: Blackwell Publishing, 2016. p. 55–67.
- HALLAP, T. *et al.* Changes in semen quality in Estonian Holstein AI bulls at 3, 5 and 7 years of age. **Reproduction in Domestic Animals**, Germany, v. 41, p. 214-218, 2006.
- HAMMERSTEDT R. H. *et al.* Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, United States, v. 11 p. 73–88, 1990.

- HARRISON, R. A. P. *et al.* Bicarbonate/co₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. **Molecular Reproduction and Development**, United States, v. 45, p. 378–391, 1996.
- HENKEL, R. *et al.* Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocyte spermic patients. **Fertility and Sterility**, United States, v. 83, p. 635-642, 2005.
- HERNÁNDEZ-AVILÉS, C. *et al.* Effects of glucose concentration in semen extender and storage temperature on stallion sperm quality following long-term cooled storage. **Theriogenology**, United States, v. 147, p. 1-9, 2020.
- HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, Netherlands, v. 62, p. 3-22, 2000.
- HOSHI, K. *et al.* Variation in the cholesterol/phospholipid ratio in human spermatozoa and its relation with capacitation. **Human Reproduction**, United Kingdom, v. 5, p. 71-74, 1990.
- HU, E. *et al.* High-throughput cryopreservation of spermatozoa of blue catfish (*Ictalurus furcatus*): Establishment of an approach for commercial-scale processing. **Cryobiology**, United States, v. 62, p. 74–82, 2011.
- IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA, Banco de Dados Agregados. **Tabela 3939**: efetivo dos rebanhos, por tipo de rebanho. Rio de Janeiro, Brasil, 2020. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939>. Acesso em: 10 jun. 2021.
- ILJENKAITE, A. *et al.* The effect of royal jelly on boar sperm viability and motility during liquid storage for 96 hours. Lithuanian University of Health Sciences, Veterinary Academy, Kaunas, Lithuania. **Acta Veterinaria Brno**, Czechia, v. 89, p. 47-53, 2020.
- JEULIN, C. *et al.* Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. **Gamete Research**, United States, v. 24, p. 185-196, 1989.
- JIMENEZ, T. *et al.* Activity of the Na, K-ATPase α 4 Isoform is regulated during sperm capacitation to support sperm motility. **Journal of Andrology**, United States, v. 33, p. 1047–1057, 2012.
- KADIRVEL, G. *et al.* Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen

- species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. **Animal Reproduction Science**, Netherlands, v. 114, p. 125-134, 2009.
- KASIMANICKAM, R. *et al.* Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4°C. **Small Ruminant Research**, Netherlands, v. 99, p. 208-213, 2011.
- KATILA, T. Procedures for handling fresh stallion semen. **Theriogenology**, United States, v. 48, p. 1217-1227, 1997.
- KERSHAW, C. M. *et al.* The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. **Theriogenology**, United States, v. 64, p. 1225–1235, 2005.
- KIDD, P. Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. **Alternative Medicine Review**, United States, v. 2, p. 155-176, 1997.
- KOTHARI, S. *et al.* Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. **Indian Journal of Experimental Biology**, India, v. 48, p. 425-435, 2010.
- KRAPF, D. *et al.* Inhibition of Ser/Thr phosphatases induces capacitation-associated signaling in the presence of Src kinase inhibitors. **Journal of Biological Chemistry**, United States, v. 285, p. 7977-7985, 2010.
- KULAKSIZ, R. *et al.* The effects of different extenders and myo-inositol on post-thaw quality of ram semen. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, Turkey, v. 17, p. 217-222, 2011.
- KULAKSIZ, R. *et al.* The effect of different extenders on the motility and morphology of ram sperm frozen or stored at 4°C. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, Turkey, v. 36, p. 177-182, 2012.
- KULAKSIZ, R. *et al.* The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram semen. **Small Ruminant Research**, Netherlands, v. 88, p. 12-15, 2010.
- LAMIRANDE, E. D. *et al.* A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, United States, v. 16, p. 21-25, 1993.
- LAMIRANDE, E. *et al.* Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, United Kingdom, v. 2, p. 48-54, 1997.

- LEAHY, T. *et al.* Seminal plasma and its effect on ruminant spermatozoa during processing. **Reproduction in Domestic Animals**, Germany, v. 47, p. 207-213, 2012.
- LEAHY, T. *et al.* Seminal plasma proteins do not consistently improve fertility after cervical insemination of ewes with non-sorted or sex-sorted frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, Australia, v. 22, p. 606-612, 2010.
- LEAHY, T. *et al.* Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. **Reproduction**, United Kingdom, v. 142, p. 759-778, 2011.
- LEBOEUF, B. *et al.* Effect of native phosphocaseinate on the in vitro preservation of fresh semen. **Theriogenology**, United States, v.60, p.867–877, 2003.
- LEEMANS, B. *et al.* Update on mammalian sperm capacitation: how much does the horse differ from other species? **Reproduction**, United Kingdom, v. 157, p. R181-R197, 2019.
- LIU, Z. *et al.* Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. **Cryobiology**, United States, v. 37, p. 219-30, 1998.
- LONE, S.A. *et al.* Study on correlation of sperm quality parameters with antioxidant and oxidant status of buffalo bull semen during various stages of cryopreservation. **Andrologia**, Germany, v. 50, e12970, 2018.
- LONGOBARDI, V. *et al.* Cholesterol-loaded cyclodextrins prevent cryocapacitation damages in buffalo (*Bubalus bubalis*) cryopreserved sperm. **Theriogenology**, United States, v. 89, p. 359-364, 2017.
- LOPEZ-SAEZ, A. *et al.* Liquid storage (5°C) of ram semen in different diluents. **Archives of Andrology**, United States, v. 44, p. 155-164, 2000.
- LUCONI, M. *et al.* Enhancement of mouse sperm motility by the PI3-kinase inhibitor LY294002 does not result in toxic effects on preimplantation embryo development. **Human Reproduction**, United Kingdom, v. 20, p. 3500-3504, 2005.
- MAHMOUD, A.I. *et al.* Oviduct fluid and heparin induce similar surface changes in bovine sperm during capacitation: a flow cytometric study using lectins. **Molecular Reproduction and Development**, United States, v. 43, p. 554-560, 1996.

- MAIA, M. S. Tecnologia de sêmen e inseminação artificial em caprinos e ovinos. *In: CONGRESSO PERNAMBUCANO DE MEDICINA VETERINÁRIA*, 6.; SEMINÁRIO NORDESTINO DE CAPRINO-OVINOCULTURA, 7., 2015, Recife. **Anais** [...]. Recife: CRMV-PE; SPEMVE, 2015. 10 p. Tema: Saúde animal e produção sustentável no Nordeste: desafios e inovações tecnológicas.
- MAKLER, A. *et al.* Use of a sealed mini-chamber to investigate human sperm motility in real time under aerobic and anaerobic conditions. **Archives of Andrology**, United States, v. 29, p. 255-261, 1992.
- MALDJIAN, A. *et al.* Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Theriogenology**, United States, v. 63, p. 411-421, 2005.
- MANJUNATH, P. *et al.* Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. **Biology of Reproduction**, United States, v. 50, p. 27–37, 1994.
- MANJUNATH, P. *et al.* Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, Ireland, v. 53, p. 109-119, 2002.
- MANN, T. Experimental approach to study of semen and male reproductive function. **International Journal of Fertility**, United States, v. 23, p. 133–137, 1978.
- MANN, T. *et al.* **Male reproductive function and semen: themes and trends in physiology, biochemistry and investigative andrology**. United States: Springer Science & Business Media, 2012.
- MARTIN, I. C. A. Diluents for the Preservation of Ram Spermatozoa I. Diluents Used At 37° C and 5°C Containing Casein. **Australian Journal of Biological Sciences**, Australia, v. 19, p. 645-654, 1966.
- MARTINEZ-PASTOR, F. *et al.* Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry. **Reproduction in Domestic Animals**, Germany, v. 45, p. 67–78, 2010.
- MARTINS, C. F. *et al.* **Atlas de morfologia espermática bovina**. Brasília, DF: Embrapa, 2016.
- MATA-CAMPUZANO, M. *et al.* Effect of several antioxidants on thawed ram spermatozoa submitted a 37 °C up to 4 h. **Reproduction in Domestic Animals**, Germany, v. 47, p. 907-914, 2012.

- MATA-CAMPUZANO, M. *et al.* Motility of liquid stored ram spermatozoa is altered by dilution rate independent of seminal plasma concentration. **Animal Reproduction Science**, Netherlands, v. 162, p. 31-36, 2015.
- MAXWELL, W. M. C. *et al.* Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. **Society of Reproduction and Fertility**, United Kingdom, v. 64, p. 13–38, 2007.
- MAXWELL, W. M. C. *et al.* Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. **Molecular Reproduction and Development**, United States, v. 46, p. 408–18. 1997.
- MAXWELL, W. M. C. *et al.* Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. **Theriogenology**, United States, v. 52, p. 1353-1362, 1999.
- MAXWELL, W. M. C. *et al.* Liquid storage of ram semen: a review. **Reproduction, Fertility and Development**, Australia, v. 6, p. 613-638, 1993.
- MAXWELL, W. M. C. *et al.* Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, Netherlands, v. 42, p. 55-65, 1996.
- MEDEIROS, C. M. O. *et al.* Current status of sperm cryopreservation: why isn't better. **Theriogenology**, United States, v. 57, p. 327-344, 2002.
- MEDEIROS, C. M. O. *et al.* Changes in lectin binding to bovine sperm during heparin-induced capacitation. **Molecular Reproduction and Development**, United States, v. 44, p. 525-532. 1996.
- MENDOZA, N. *et al.* New insights into the mechanisms of ram sperm protection by seminal plasma proteins. **Biology of Reproduction**, United States, v. 88, p. 1-15, 2013.
- MIES FILHO, A. **Reprodução dos Animais e Inseminação Artificial**, 6. ed. Porto Alegre: Sulina, 1987. v. 2.
- MOLINIA, F. C. *et al.* In vitro evaluation of zwitterion buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. **Reproduction, Nutrition & Development**, France, v. 34, p. 491-500, 1994.
- MORTIMER, S. T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, United Kingdom, v. 3, p. 403-439, 1997.

- MOURA, P. P. *et al.* Caracterização de proteínas do plasma seminal e sua relação com parâmetros de qualidade do sêmen criopreservado em ovinos. **Ciência Rural**, Brasil, v. 40, p. 1154-1159, 2010.
- MUIÑO-BLANCO, T. *et al.* Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. **Reproduction in Domestic Animals**, Germany, v. 43, p. 18-31, 2008.
- NAHAS, G. C. In vitro and in vivo effects of amine buffers. Introductory remarks. **Annals of the New York Academy of Sciences**, United States, v. 92, p. 337-40, 1961.
- NASCIMENTO, J. *et al.* Effects of sperm concentration and straw volume on motion characteristics and plasma, acrosomal, and mitochondrial membranes of equine cryopreserved spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, United States, v. 28, p. 351–358, 2008.
- NG, K. Y. B. *et al.* In vivo oxygen, temperature and pH dynamics in the female reproductive tract and their importance in human conception: a systematic review. **Human Reproduction Update**, United Kingdom, v. 24, p. 15–34, 2017.
- NIKI, H. P. Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, United States, v. 54, p. 1119S-1124S, 1983.
- NUNES, J. F. *et al.* Strategies to improve the reproductive efficiency of goats in Brazil. **Small Ruminant Research**, Netherlands, v. 98, p. 176-184, 2011.
- O'HARA, L. *et al.* Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. **Theriogenology**, United States, v. 73, p. 541-549, 2010.
- OKAMURA, N. *et al.* Purification of bicarbonate sensitive sperm adenyllyl cyclase by 4-acetamido-49-isothiocyanostilbene- 2, 29- disulfonic acid affinity chromatography. **Journal of Biological Chemistry**, United States, v. 266, p. 17754-17759, 1991.
- OKANO, D. S. *et al.* In vitro evaluation of cryopreserved bovine sperm and its relation to field fertility in fixed-time artificial insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, Germany, v. 54, p. 604-612, 2019.
- OLIVARES, C. C. S. *et al.* Mini-percoll gradient may be used for frozen-thawed sperm selection in sheep. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Brasil, v. 71, p. 455-463, 2019.

- OLIVEIRA, R. V. *et al.* Avaliação de espermatozoides caprinos congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101®) ou TRIS. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Brasil, v. 6, p. 1295-1302, 2011.
- O'SHEA, T. *et al.* Effect of casein, lecithin, glycerol, and storage at 5 C on diluted ram and bull semen. **Australian Journal of Biological Sciences**, Australia, v. 19, p. 871-882, 1966.
- OSMAN, R. A. *et al.* Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, United States, v. 160, p. 828-833, 1989.
- ÕURA, C. *et al.* Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. **International Review of Cytology**, United States, v. 122, p. 105-151, 1990.
- PALHÃO, M. P. *et al.* Uso do sêmen resfriado em programas de inseminação artificial em caprinos. **O Embrião**, Brasil, v. 26, p. 6-7, 2006.
- PARKS, J. E. *et al.* Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. **Biology of Reproduction**, United States, v. 32, p. 653–668, 1985.
- PARKS, J. E. *et al.* Lipid-composition and thermotropic phase-behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, United States, v. 29, p. 255–266, 1992.
- PARRISH, J. J. Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. **Theriogenology**, United States, v. 81, p. 67-73, 2014.
- PATRAT, C. *et al.* The acrosome reaction in human spermatozoa. **Biology of the Cell**, France, v. 92, p. 255-266, 2000.
- PAUL, R. K. *et al.* Modulation of seminal plasma content in extended semen improves the quality attributes of ram spermatozoa following liquid preservation at 3–5°C. **Reproduction in Domestic Animals**, Germany, v. 53, p. 1200-1210, 2018.
- PAULENZ, H. L. *et al.* Effect of milk and TRIS-based extenders on the fertility of sheep inseminated vaginally once or twice with liquid ram semen. **Theriogenology**, United States, v. 60, p. 759-766, 2003.
- PAULENZ, H. L. *et al.* Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. **Theriogenology**, United States, v. 57, p. 823-836, 2002.

- PEKNICOVA, J. *et al.* Changes in immunochemical localization of acrosomal and sperm proteins in boar spermatozoa during capacitation and induced acrosome reaction. **Animal Reproduction Science**, Netherlands, v. 35, p. 255-271, 1994.
- PEÑA, A. *et al.* Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. **Theriogenology**, United States, v. 54, p. 703–718, 2000.
- PEREIRA, L. M. C. *et al.* Inseminação artificial em ovinos e caprinos. **Anais da Semana do Curso de Zootecnia-SEZUS**, Brasil, v. 11, p. 1, 2017.
- PEREZ-PE, R. *et al.* Semen plasma pro-teins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. **Theriogenology**, United States, v. 56, p. 425–434, 2001.
- PEREZ, L. J. *et al.* Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. **Theriogenology**, United States, v. 46, p. 131-140, 1996.
- PEREZ, L. J. *et al.* *In vitro* capacitation and induction of acrosomal exocytosis in ram spermatozoa as assessed by the chlortetracycline assay. **Theriogenology**, United States, v. 45, p. 1037–1046, 1996.
- PESQUISA com consumidores: tem mercado. **Revista da Embrapa Pecuária Sul**, Bagé, RS, ano 9, n. 10, p. 5-7, dez. 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/1355035/2751150/Revista+Dezembro+2018/5d3e3265-d48b-800e-7621-2896afdc6857>. Acesso em: 12 abr. 2021.
- PETERSON, K. M. A. P. *et al.* Microscopic and flow cytometric semen assessment of Dutch AI-bucks: effect of semen processing procedures and their correlation to fertility. **Theriogenology**, United States, v. 67, p. 863-871, 2007.
- PIEHLER, E. *et al.* Dynamic quantification of the tyrosine phosphorylation of the sperm surface proteins during capacitation. **Cytometry A**, United States, v. 69, p. 1062–70, 2006.
- PLANTE, M. *et al.* Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. **Fertility and Sterility**, United States, v. 62, p. 387-393, 1994.

- PONS-REJRAJI, H. *et al.* Cryopreservation affects bovine sperm intracellular parameters associated with capacitation and acrosome exocytosis. **Reproduction, Fertility and Development**, Australia, v. 21, p. 525-537, 2009.
- PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, Netherlands, v. 63, p. 215-225, 2006.
- RAJORIYA, J. S. *et al.* Exogenous cholesterol prevents cryocapacitation-like changes, membrane fluidity, and enhances in vitro fertility in bubaline spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, Germany, v. 55, p. 726-736, 2020.
- RAPHAEL, C. F. **Efeitos da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozóide equino refrigerado.** 2007. 112 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- RATHI, R. *et al.* Progesterone induces acrosome reaction in stallion spermatozoa via a protein tyrosine kinase dependent pathway. **Molecular Reproduction and Development**, United States, v. 64, p. 120–128, 2003.
- REDDY, N. S. S. *et al.* Effects of adding taurine and trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm quality following cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, Netherlands, v. 119, p. 183-190, 2010.
- RIBEIRO, L. A. O. *et al.* Prenhez em rebanhos ovinos do Rio Grande do Sul-Brasil. **Ciência Rural**, Brasil, v. 32, p. 637-641, 2002.
- RICKER, J. V. *et al.* Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. **Biology of Reproduction**, United States, v. 74, p. 359–365, 2006.
- RODRIGUES, B. A. **Efeito do diluidor à base de albumina sérica bovina (BSA) sobre a viabilidade in vitro do sêmen canino criopreservado.** 1997. 176 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Role of the oviduct in sperm capacitation. **Theriogenology**, United States, v. 68, p. 138-146, 2007.
- ROȘCA, N. *et al.* Protein-lipid and cholesterol-phospholipid ratio as an indicator of cryoresistance of gametes of farm animals. **Scientific Papers. Series D. Animal Science**, Romania, v. 63, p. 240-244, 2020.

- SAALU, L. C. The incriminating role of reactive oxygen species in idiopathic male infertility: an evidence-based evaluation. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Pakistan, v. 13, p. 413-422, 2010.
- SALAMON, S. *et al.* Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, Netherlands, v. 38, p. 1-36, 1995.
- SALAMON, S. *et al.* Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, Netherlands, v. 62, p. 77–111, 2000.
- SAMO, M. U. *et al.* Effects of aerobic and anaerobic incubation on the quality of ram semen. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Pakistan, v. 9, p. 123-127, 2006.
- SAMPER, J. C. *et al.* **Current therapy in equine reproduction**. United States: Saunders Elsevier, 2007.
- SANOCKA, D. *et al.* Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, United Kingdom, v. 2, p. 1-7, 2004.
- SANTOS, I. W. **Albumina sérica bovina como fonte proteica do diluidor Tris (hidroximetil amino metano) para congelação do sêmen canino**. 2004. 63 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)- Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2004.
- SARLOS, P. *et al.* Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinaria Hungarica**, Hungary, v. 50, p. 235–245, 2002.
- SELIVONCHICK, D. P. *et al.* Structure and metabolism of phospholipids in bovine epididymal spermatozoa. **Biochimica et Biophysica Acta**, Netherlands, v. 618, p. 242-254, 1980.
- SENGER, P. L. Endocrinology of the Male and Spermatogenesis. *In*: SENGER, P. L. **Pathways to Pregnancy and Parturition**. 2nd ed. United States: Current Conceptions, Inc., Pullman, 2003.
- SERAFINI, R. *et al.* Trypan Blue/Giemsa staining to assess sperm membrane integrity in salernitano stallions and its relationship to pregnancy rates. **Reproduction in Domestic Animals**, Germany, v. 49, p. 41–47, 2013.
- SETYAWAN, E. M. N. *et al.* Spermine reduces reactive oxygen species levels and decreases cryocapacitation in canine sperm cryopreservation.

- Biochemical and Biophysical Research Communications**, United States, v. 479, p. 927-932, 2016.
- SEVERO, C. N. História da inseminação artificial no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Brasil, v. 39, p. 17-21, 2015.
- SHEKARRIZ, M. *et al.* Incidence and level of seminal reactive oxygen species in normal men. **Urology**, United States, v. 45, p. 103–107, 1995.
- SIKKA, S. C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. **Frontiers in Bioscience**, United States, v. 1, p. 78-86, 1996.
- SILVA, P. F. N. *et al.* Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, United States, v. 65, p. 958-978, 2006.
- SIMONS, K. *et al.* Lipid rafts and signal transduction. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, United Kingdom, v. 1, p. 31-39, 2000.
- SMITH, J. F. *et al.* Seasonal changes in the protein content and composition of ram seminal plasma. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, New Zealand, v. 59, p. 223-225, 1999.
- SMITH, M. F. *et al.* Reproduction in domestic ruminants during the past 50 years: discovery to application. **Journal of Animal Science**, United States, v. 96, p. 2952–2970, 2018.
- SOLEILHAVOUP, C. *et al.* Ram seminal plasma proteome and its impact on liquid preservation of spermatozoa. **Journal of Proteomics**, Netherlands, v. 9, p. 245-260, 2014.
- SOUZA, W. L. *et al.* Effect of different concentrations of melatonin to ram spermatozoa on oxidative stress after cryopreservation. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasil, v. 36, p. 657-664, 2016.
- SQUIRES, E. L. *et al.* Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, United States, v. 59, n. 1, p. 151-170, 2003.
- STOREY, K. B. *et al.* Molecular physiology of freeze tolerance in vertebrates. **Physiological Reviews**, United States, v. 97, p. 623-665, 2017.
- STRZEZEK, J. *et al.* Proteomics of boar seminal plasma – current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. **Reproduction Biology**, United States, v. 5, p. 279–290, 2005.
- SUZUKI, K. *et al.* Capacitation status and in vitro fertility of boar spermatozoa: effects of seminal plasma, cumulus-oocyte-complexes-conditioned medium

- and hyaluronan. **International Journal of Andrology**, United Kingdom, v. 25, p. 84-93, 2002.
- TAKAKURA, K. *et al.* Rapid and irreversible inactivation of protein tyrosine phosphatases PTP1B, CD45, and LAR by peroxynitrite. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, United States, v. 369, p. 197-207, 1999.
- THÉRIEN, I. *et al.* Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, United States, v. 59, p. 768–776, 1998.
- TREMELLEN, K. Oxidative stress and male infertility – a clinical perspective. **Human Reproduction Update**, United Kingdom, v. 14, p. 243–258, 2008.
- TULSIANI, D. R. *et al.* Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. **Biology of Reproduction**, United States, v. 57, p. 487-494, 1997.
- UBAH, S. A. *et al.* Comparative study of chicken egg yolk and quail egg yolk in two chilled canine semen extenders. **Sokoto Journal of Veterinary Sciences**, Nigeria, v. 17, p. 62-69, 2019.
- VALENÇA, R. M. B. *et al.* Espécies reativas ao oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Brasil, v.31, p.47-53, 2007.
- VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, United Kingdom, v. 39, p. 44-84, 2007.
- VAN GESTEL, R. A. *et al.* Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. **Molecular Human Reproduction**, United Kingdom, v. 11, p. 583–590, 2005.
- VERSTEGEN, J. P. *et al.* Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: in vitro and in vivo studies. **Theriogenology**, United States, v. 64, p. 720-733, 2005.
- VIANA, J. G. A. *et al.* Cadeia Produtiva da Ovinocultura No Rio Grande do Sul: Um Estudo Descritivo. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, Brasil, v. 2, p. 9-20, 2009.
- VILLEMURE, M. *et al.* Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. **Reproduction and Biology Endocrinology**, United States, v. 1, p. 39, 2003.

- VISCONTI, P. E. *et al.* Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, United States, v. 59, p. 1-6, 1998.
- VISCONTI, P. E. *et al.* Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. **Asian Journal of Andrology**, United Kingdom, v. 13, p. 395, 2011.
- WANG, X. F. *et al.* Involvement of CFTR in uterine bicarbonate secretion and the fertilizing capacity of sperm. **Nature Cell Biology**, United Kingdom, v. 5, p. 902-906, 2003.
- WARD, C. R. *et al.* Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. **Developmental Biology**, United States, v. 104, p. 287–296, 1984.
- WASSARMAN, P.M. Mammalian fertilization: Molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis and fusion. **Cell**, United States, v. 96, p. 175-183, 1999.
- WATSON, P. F. Recent development and conception in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, Australia, v. 7, p. 871-891, 1995.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, Netherlands, v. 60-61, p. 481-492, 2000.
- WATSON, P. F. *et al.* The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5°C. **Australian Journal of Biological Sciences**, Australia, v. 28, p. 145-152, 1975.
- WHITE, I. G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reproduction, Fertility and Development**, Australia, v. 5, p. 639-658, 1993.
- YANAGIMACHI, R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. **Zygote**, Canada, v. 2, p. 371-372, 1994.
- YANAGIMACHI, R. Mechanisms of fertilization in mammals. *In*: MASTROIANNI JUNIOR, L.; BIGGERS, J. D. (ed.). **Fertilization and embryonic development in vitro**. United States: Springer, 1981. p. 81-182.
- YANAGIMACHI, R. The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. **Journal of Reproduction and Fertility**, United Kingdom, v. 23, p. 193–196, 1970.
- ZEN, S. D. *et al.* Evolução da caprino e ovinocultura. **Ativos Ovinos e Caprinos**, Brasília, ano 1, 2014.

ZHANG, X. *et al.* Tracing sperm acrosome differentiation in the testis and maturation in the epididymis of the tammar wallaby (*Macropus eugenii*) with a 45-kDa acrosome-membrane-associated protein. **Reproduction, Fertility and Development**, Australia, v. 14, p. 69-77, 2002.

10. ANEXOS

10.1 ANEXO 1 – Coloração de Azul de Tripano e Giemsa (ATG)

Técnica de coloração de Azul de Tripano e Giemsa (ATG), descrita no Atlas Embrapa (MARTINS *et al.*, 2016).

Solução estoque de Giemsa: Misturar os reagentes (5 g de Giemsa Merck) + 330 mL de glicerol) e colocar no banho maria a 50°C por 1 h.

- Homogeneizar a solução a cada 15 min e manter protegido da luz em vidro âmbar.
- Deixar esfriar e acrescentar 330 mL de metanol.
- Maturar a solução em frasco âmbar por no mínimo 15 dias à temperatura ambiente antes de usar (agitar o frasco a cada 5 dias).
- Filtrar em papel-filtro quando for utilizar e armazenar sem contato com a luz.
- Solução Giemsa para uso: Preparar a solução de trabalho no dia do uso- Diluir 8 mL de água destilada (pH= 6,8 a 7,1) com 4 mL de corante Giemsa estoque e homogeneizar a solução.

Procedimento para preparação da amostra:

1. Misturar 15 µL de sêmen com 15 µL do corante azul de tripano a 0,4% (1:2 v/v; Sigma, T-8154) em tubo de 1,5 mL e incubar por 15 min a 37°C (espermatozoides devem estar vivos).
2. Fazer três esfregaços usando 3 a 4 µL da amostra.
3. Secar os esfregaços rapidamente em fluxo de ar ou secador.
4. Fixar os esfregaços em álcool absoluto por 5 min e deixar as lâminas secarem.
5. Corar os esfregaços por no mínimo 40 min com a solução de Giemsa uso (na estufa a 38,5°C).
6. Lavar lâminas em água corrente e deixar secar para fazer a leitura.
7. Avaliar 100/200 espermatozoides em microscópio de campo claro em aumentos de 400x e 1.000x.

Modo de avaliação dos espermatozoides:

Cabeça azul e acrossomo rosa escuro: mortos com acrossomo íntegro.

Cabeça azul e acrossomo descorado: mortos com reação acrossomal.

Cabeça rosa clara e acrossomo rosa escuro: vivos com acrossomo íntegro.

Cabeça rosa claro e acrossomo descorado: vivos com reação acrossomal.

10.2 ANEXO 2 – Coloração com clortetraciclina (CTC)

Para avaliar a capacitação espermática *in vitro* será utilizada a técnica de clortetraciclina (CTC), descrita por Pérez *et al.* (1996) modificada.

1. Aquecer 5 mL de solução tampão-CTC à 37°C;
2. Preparar a solução de CTC (pH= 7,8): Diluir 2 mg de CTC + 4,4 mg de L-cisteína em 5 mL de tampão-CTC (240 mg de TRIS + 760 mg NaCl em 100 mL de água destilada). Filtrar e guardar a 4°C.
3. Aliquotar 10 µL de solução CTC, 10 µL de PFM (paraformaldeído) cada um em tubos de microcentrífuga e colocar na estufa à 37 °C.
4. Remover o diluente com a técnica de minipercol centrifugando a amostra à 2000 rpm por 10 min.
5. Remover o sobrenadante.
6. Ressuspender o *pellet* em meio Sperm TALP e centrifugar a 1000 rpm por 5 min.
7. Em sala escura, adicionar 5 µL da amostra de sêmen no tubo de micrcentrífuga contendo 10 µL solução de CTC fresco, preparado no dia.
8. Após 1 min de incubação em placa aquecida a 35°C, adicionar 10 µL de uma solução de PFM a 12%.
9. Colocar uma gota de 10 µL da amostra corada entre lâmina e lamínula.
10. Pressionar para remover o excesso.
11. Armazenar as amostras em compartimentos a prova de luz e refrigerar a 4-5°C por no mínimo 4 h.
12. Ler em epifluorescência com filtro de 355-425 nm na linha de excitação com emissão de fluorescência em filtro RKP 455, com contagem de 200 células, em aumento de 1000x, sob imersão.

10.3 ANEXO 3 – Diluentes para refrigeração de sêmen ovino

- **Citrato-gema**

- *Solução mãe de citrato de sódio a 2,94%*

Citrato de Sódio (2 H ₂ O)	2,94 g
Água Milli-Q, q.s.p.	100,0 mL

- *Diluyente Citrato-gema*

Solução mãe	80%
Gema de ovo	20%

- **Leite Desnatado a 10%**

Leite em Pó Desnatado CCGL [®]	10 g
Água Milli-Q, q.s.p.	100 mL

Aquecer a solução a 95°C por 15 min.

- **TRIS-gema**

- *Solução mãe de diluyente TRIS*

TRIS (Tris-hidroxi-amino-etano)	3,63 g
Ácido Cítrico	1,99 g
Frutose	0,50 g
Água Milli-Q, q.s.p.	100 mL

- *Diluyente TRIS-gema*

Solução mãe	80%
Gema de ovo	20%

pH e osmolaridade dos diluentes:

pH: 6,5 – 7,0

Osmolaridade: 280-290 mOsm/kg

10.4 ANEXO 4 – Espermograma

Tabela 2. Média (\pm erro padrão) da proporção de alterações espermáticas identificadas em seis ejaculados de dois carneiros utilizados no experimento

<i>Defeitos Maiores (%)</i>	Média \pm e.p.	Máximo	Mínimo
Formas Teratológicas (%)	0,2 \pm 0,3	0,5	0,0
Defeito na peça intermediária (%)	0,5 \pm 0,6	1,5	0,0
Gota protoplasmática proximal (%)	2,8 \pm 3,7	10,0	0,0
Cauda fortemente dobrada (%)	7,5 \pm 5,4	14,5	2,0
Total (%)	11,3 \pm 7,4	19,5	2,5
<i>Defeitos Menores (%)</i>	Média \pm e.p.	Máximo	Mínimo
Cabeça solta normal (%)	1,3 \pm 1,8	4,5	0,0
Implantação Abaxial, Retroaxial (%)	1,1 \pm 1,0	2,0	0,0
Gota Protoplasmática Distal (%)	3,8 \pm 5,6	15,0	0,0
Cauda Simplesmente Dobrada (%)	2,3 \pm 0,8	3,0	1,0
Cauda Enrolada na Porção Terminal (%)	3,5 \pm 4,9	11,0	0,0
Total (%)	11,7 \pm 11,8	33,0	2,5
Total de defeitos (%)	23,0 \pm 16,9	49,5	7,5

11. VITA

Mônica Elisa Bartmer é filha de Ruth Bartmer, nascida em 23 de agosto de 1988, em Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

Realizou o Ensino Fundamental na Escola Municipal de Ensino Fundamental Vereador Antônio Giúdice, no Município de Porto Alegre (RS). Em 2003 iniciou o Curso Técnico em Eletrônica concomitantemente com o Ensino Médio na Escola Técnica Santo Inácio em Porto Alegre (RS). Ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Dom Pedrito, RS, no primeiro semestre de 2012. Ao longo da graduação foi bolsista de Iniciação Científica no período de 04/2013 a 12/2013, sob orientação da Professora Dra. Adriana Pires Neves, no projeto de “Comportamento Ingestivo de Equinos da Raça Mini-Horse em Distintas Ofertas de Forragem” na área de Nutrição e Comportamento Animal. Participou de intercambio-sanduiche pelo programa Ciência Sem Fronteira no período de 05/2014 a 05/2015 na *Southern Illinois University*, Illinois, EUA. Atuou como encarregada de tambo leiteiro no município de Sant’anna do Livramento no período de 01/2018 a 12/2018, com ênfase em manejo e nutrição de bovinos leiteiros.

Em abril de 2019 deu início ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), na área de Melhoramento e Genética Animal, sob orientação do Professor Dr. Marcelo Bertolini.