

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

JOÃO PEDRO BRANDÃO ZANDONAIDE

A AKAP4 do espermatozóide como biomarcador da fertilidade de touros

Uberlândia - MG

2024

JOÃO PEDRO BRANDÃO ZANDONAIDE

A AKAP4 do espermatozóide como biomarcador da fertilidade de touros

Tese de doutorado apresentado à Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Biotecnologia da reprodução.

Orientador: Gustavo Guerino Macedo

Uberlândia - MG

2024

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Z27 2024	<p>Zandonaide, João Pedro Brandão, 1991- ProAKAP4: Biomarcador da fertilidade para seleção de touro em programa de inseminação [recurso eletrônico] / João Pedro Brandão Zandonaide. - 2024.</p> <p>Orientador: Gustavo Guerino Macedo. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2024.653 Inclui bibliografia.</p> <p>1. Veterinária. I. Macedo, Gustavo Guerino, 1981-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós- graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.</p> <p>CDU: 619</p>
-------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias
BR 050, Km 78, Campus Glória , Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 2512-6811 - www.ppgcv.famev.ufu.br - mesvet@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Ciências Veterinárias				
Defesa de:	Tese de Doutorado PPGCVET Nº 05/2024				
Data:	16 de Agosto de 2024	Hora de início:	08:30	Hora de encerramento:	12:45
Matrícula do Discente:	12013VET003				
Nome do Discente:	João Pedro Brandão Zandonaide				
Título do Trabalho:	A AKAP4 do espermatozoide como biomarcador da fertilidade de touros				
Área de concentração:	Produção Animal				
Linha de pesquisa:	Biotécnicas e Eficiência Reprodutiva				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Técnicas laboratoriais e moleculares na reprodução animal				

Reuniu-se por vídeoconferência na Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: Renata Lançoni - (FAMEV/UFU); Ricarda Maria dos Santos - (FAMEV/UFU); Cristiano Pereira Barbosa - (UNIUBE); Marcilio Nichi - (USP); Gustavo Guerino Macedo - (UFMS) orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Gustavo Guerino Macedo, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do

Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Ricarda Maria dos Santos, Professor(a) do Magistério Superior**, em 16/08/2024, às 20:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcilio Nichi, Usuário Externo**, em 19/08/2024, às 14:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renata Lançoni, Professor(a) do Magistério Superior**, em 19/08/2024, às 14:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Guerino Macedo, Usuário Externo**, em 19/08/2024, às 14:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **CRISTIANO PEREIRA BARBOSA, Usuário Externo**, em 20/08/2024, às 11:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5554146** e o código CRC **7E985DD6**.

JOÃO PEDRO BRANDÃO ZANDONAIDE

A AKAP4 do espermatozóide como biomarcador da fertilidade de touros

Tese de doutorado apresentado à Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Produção Animal

Uberlândia,

Banca Examinadora:

Renata Lançoni – Doutor (UFU)

Ricarda Maria dos Santos – Doutor (UFU)

Cristiano Pereira Barbosa – Doutor (UNIUBE)

Marcilio Nichi – Doutor (USP)

Dedico este trabalho a todos que sentem-se
incapazes, que possam se reerguer.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me proporcionar a vida, a ter me destinado a ser parte de uma família excepcional na qual é, e sempre será, a minha base e meu equilíbrio para que possa trilhar os melhores caminhos.

Agradeço imensamente a todos os docentes que fizeram parte da minha vida acadêmica e que puderam compartilhar nobre conhecimento nos quais são e se fazem necessários na minha vida profissional. Em especial agradeço aos professores André Belico de Vasconcelos, Teresinha Inês de Assumpção e Gustavo Guerino Macedo que tiveram papel crucial para meu aprimoramento acadêmico. Sem sombra de dúvidas o incentivo dessas pessoas me fizeram alcançar feitos que acreditava serem impossíveis. André Belico Vasconcelos meu primeiro orientador, meu primeiro mentor obrigado pelos ensinamentos acadêmicos e de vida, a sua semente plantada gerou frutos. Teresinha Inês Assumpção, obrigado por todo apoio e suporte, sigo lhe tendo como exemplo de pessoa e profissional, não imaginaria encontrar solicitude tamanha em minha vida. Gustavo Guerino Macedo obrigado pelo conhecimento partilhado, tamanho conhecimento e visão na pesquisa como o seu é raro e incentiva pensar grande.

Agradeço aos meus mentores profissionais da andrologia bovina, Luis Alfredo Deragon, Neimar Correa Severo, Solange Almeida Martins e Lucia Helena Rodrigues. Me sinto lisonjeado em ter trabalhado e seguir trabalhando com grandes nomes da andrologia no Brasil.

Agradeço a instituição Alta Genetics por ter dado todo suporte para que este caminho fosse trilhado.

“Acredite que você pode e você já está no meio do caminho.”

(ROOSEVELT, 1901)

RESUMO

Apesar de existirem reprodutores que apresentam ejaculados com características dentro dos padrões recomendados para sêmen congelado, muitos deles ainda não atingem índices de concepção satisfatórios, sendo considerados subfêrteis ou infêrteis. Essa condição acarreta perdas econômicas significativas para a produção bovina. Com o objetivo de identificar parâmetros e correlações que possam elucidar questões relacionadas à infertilidade, e que sejam acessíveis em termos de custo e execução para a determinação precoce da fertilidade da dose inseminante, pesquisadores têm investigado fatores e substâncias presentes no sêmen em níveis proteômicos, metabolômicos e genômicos, buscando biomarcadores eficazes para a fertilidade. O presente estudo teve como objetivo mensurar a concentração da proteína proAKAP4 do sêmen congelado de touros determinados como alta e baixa fertilidade testados a campo. Touros de alta fertilidade apresentaram uma maior concentração de proAKAP4 no sêmen ($34,69 \pm 3,57$ ng/ 10^6 espermatozoides) em comparação com touros de baixa fertilidade ($19,48 \pm 2,06$ ng/ 10^6 espermatozoides) ($p < 0,05$). Além disso, touros de alta fertilidade demonstraram uma maior proporção de membrana plasmática íntegra ($65,83\% \pm 2,28$) em relação aos de baixa fertilidade ($56,37\% \pm 2,12$; $p = 0,0052$). A análise simultânea de membrana plasmática lesionada e acrossoma íntegro (MPLAcI) indicou menores valores para touros de alta fertilidade ($21,2\% \pm 1,23$) em comparação aos de baixa fertilidade ($26,53\% \pm 1,7$; $p = 0,0151$). Na avaliação da membrana plasmática íntegra associada ao potencial mitocondrial (PI-MS+), touros de alta fertilidade apresentaram resultados superiores ($49,72\% \pm 2,23$) em relação ao grupo de baixa fertilidade ($42,64\% \pm 1,75$; $p = 0,0205$). Na cinética espermática, observou-se uma menor presença de células não progressivas em touros de alta fertilidade ($59,39\% \pm 2,04$) em comparação aos de baixa fertilidade ($65,54\% \pm 1,87$; $p = 0,0358$), enquanto o inverso foi observado para as células progressivas ($30,78\% \pm 1,85$ e $25,29\% \pm 1,55$; $p = 0,0331$). Conclui-se que a concentração de proAKAP4 pode ser utilizada como um biomarcador celular para a fertilidade em touros.

Palavras chave: fertilidade; proteína; concepção.

ABSTRACT

Although some sires exhibit ejaculates with characteristics within the recommended standards for frozen semen, many still do not achieve satisfactory conception rates, being considered subfertile or infertile. This condition leads to significant economic losses in cattle production. To identify parameters and correlations that can elucidate issues related to infertility and are accessible in terms of cost and execution for the early determination of the insemination dose's fertility, researchers have been investigating factors and substances present in semen at proteomic, metabolomic, and genomic levels, seeking effective fertility biomarkers. The present study aimed to measure the concentration of the proAKAP4 protein in frozen semen from bulls determined to be of high and low fertility when tested in the field. High-fertility bulls had a higher concentration of proAKAP4 in semen (34.69 ± 3.57 ng/ 10^6 spermatozoa) compared to low-fertility bulls (19.48 ± 2.06 ng/ 10^6 spermatozoa) ($p < 0.05$). Additionally, high-fertility bulls demonstrated a higher proportion of intact plasma membrane ($65.83\% \pm 2.28$) compared to those of low fertility ($56.37\% \pm 2.12$; $p = 0.0052$). The simultaneous analysis of damaged plasma membrane and intact acrosome (DPMIA) showed lower values for high-fertility bulls ($21.2\% \pm 1.23$) compared to low-fertility bulls ($26.53\% \pm 1.7$; $p = 0.0151$). In the evaluation of intact plasma membrane associated with mitochondrial potential (IPM-MP+), high-fertility bulls showed superior results ($49.72\% \pm 2.23$) compared to the low-fertility group ($42.64\% \pm 1.75$; $p = 0.0205$). In sperm kinetics, there was a lower presence of non-progressive cells in high-fertility bulls ($59.39\% \pm 2.04$) compared to low-fertility bulls ($65.54\% \pm 1.87$; $p = 0.0358$), while the opposite was observed for progressive cells ($30.78\% \pm 1.85$ and $25.29\% \pm 1.55$; $p = 0.0331$). It is concluded that proAKAP4 concentration can be used as a cellular biomarker for fertility in bulls.

Keywords: fertility; protein; conception.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1 -	Gráfico da média de concentração de proAKAP4 para amostras de sêmen congelado de touros alta e baixa fertilidade em ng/10M ($p < 0,05$).....	27
-------------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Avaliação citometria de fluxo de sêmen congelado de touros alta e baixa fertilidade.....	27
Tabela 2 -	Avaliação motilidade, vigor de forma subjetiva por microscopia óptica, cinética computadorizada do sêmen descongelado e morfologia espermática de touros alta e baixa fertilidade (P<0,05).....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKAP4	Proteínas de ancoragem A-quinase
ALH	Amplitude de deslocamento lateral da cabeça
ATP	Adenina trifosfato
BCF	Frequência de batimento flagelar cruzado
CRV	
DCF	Diacetato de carboxifluoresceína
DIC	Diacetato de 6-carboxifluoresceína
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
IATF	
IFERT	
IP	Iodeto de propídio
LIN - %	Linearidade
MPLAcI	Membrana plasmática e reatividade acrossomal
OPN	Osteopontina
PGDS	
STR - %	Retilinearidade
VAP- $\mu\text{m/s}$	Velocidade média da trajetória
VCL- $\mu\text{m/s}$	Velocidade curvilínea
VSL- $\mu\text{m/s}$	Velocidade linear progressiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	Integridade de membrana plasmática	15
2.2	Integridade de membrana acrossomal	17
2.3	Potencial mitocondrial	17
2.4	Avaliação computadorizada da cinética espermática	18
2.5	Programas a campo de fertilidade de touros	19
2.6	Biomarcador de qualidade espermática e fertilidade	20
2.7	ProAKAP4.....	22
4	MATERIAL E MÉTODO.....	24
3.1	Avaliação por citometria de fluxo	24
3.2	Avaliação da cinética espermática	25
3.3	Avaliação da concentração de proAKAP4	26
3.4	Avaliação Estatística.....	26
4	RESULTADOS	27
5	DISCUSSÃO.....	30
6	CONCLUSÃO.....	34
	REFERÊNCIAS.....	35

1 INTRODUÇÃO

A pecuária brasileira continua a ser um componente significativo do Produto Interno Bruto (PIB) nacional, com uma estimativa de valor monetário de R\$ 734,6 bilhões em 2024, representando aproximadamente 26% do PIB juntamente com o setor agrícola em 2023 (CEPEA/CNA, 2024)¹. Parte desse crescimento nos índices de produtividade da pecuária pode ser atribuída ao avanço substancial da técnica de inseminação artificial com uso de sêmen congelado em bovinos, resultando em ganhos produtivos expressivos decorrentes da sua aplicação (SOUZA, 2023)².

Os benefícios da técnica e seu crescimento podem ser notados ao comparar o aumento do volume de doses inseminantes circulantes desde os primeiros relatos deste procedimento no país, onde em 1954 foi relatado o primeiro trabalho e resultado com a utilização de sêmen congelado para a inseminação artificial em bovinos, com a utilização de 24 vacas (SEVERO, 2013). Após 68 anos de desenvolvimento das técnicas que abrangem esta biotecnologia da reprodução, registrou-se em 2022 a entrada de 31 milhões de doses de sêmen congelado no mercado brasileiro o que demonstra a dimensão da importância da utilização da técnica e sua perenidade diante da bovinocultura brasileira. As vendas para cliente final para aptidão leite foram de 5 milhões de doses, e para aptidão corte 18 milhões, perfazendo um total de 23 milhões de doses comercializadas (INDEX ASBIA, 2022).

O fato da técnica ser abrangentemente utilizada com bons resultados e índices produtivos, não quer dizer que ainda não existam impactos que corroborem para perdas econômicas, como infertilidade de machos e fêmeas. Os prejuízos causados com a utilização de sêmen congelado de touros se dá ao fato da perda da viabilidade espermática no processo da criopreservação ou questões de subfertilidade e infertilidade dos reprodutores (LEITE, 2022).

As predições da fertilidade para os gametas do macho seguem sendo preditas por avaliações de qualidade seminal como avaliações de cinética (DORDAS-PERPINYÀ, *et al.*, 2022), morfologia e integridade das estruturas da célula espermática como acrossoma, membrana plasmática, cromatina entre outros. Apesar de existirem reprodutores que apresentem ejaculados com características dentro dos padrões recomendados ainda assim não correspondem com índices de concepção satisfatório (BERRY, *et al.*, 2014) sendo então considerados reprodutores sub férteis ou inférteis provocando perdas econômicas a atividade.

Os programas para determinação de fertilidade a campo são de extrema importância mas levam tempo considerável para definição do desempenho do reprodutor como também o custo com a utilização da própria dose inseminante de interesse nas quais não se tem conhecimento

do potencial fecundante. Outro fator de oneração dos programas se dá a estrutura necessária envolvida para distribuição e utilização das doses, determinação dos resultados e levantamento estatístico.

Visando encontrar parâmetros e correlações que possam dirimir questões de infertilidade, e que possam ser utilizados de maneira acessível para a determinação antecipada da fertilidade da dose inseminante, pesquisadores permanecem engajados em busca de fatores presentes no sêmen a nível proteômico, metabolômico e genômico que atinjam e cumpram o papel de biomarcador da fertilidade (NARUD, *et al.*, 2022).

A proteômica permite a identificação de componentes proteicos de secreções e células que possam estar associados a fisiologia reprodutiva onde possíveis correlações possam indicar a possibilidade do uso de biomarcadores para fertilidade, este, um passo de grande importância para a biotecnologia reprodutiva de machos (BARROS, *et al.*, 2013).

A proteína proAKAP4, pertencente à família das proteínas quinase A ancoradas (AKAPs), desempenha um papel crucial na organização e na regulação da arquitetura do flagelo espermático, impactando diretamente na motilidade e na fertilidade dos espermatozoides (FOSTER *et al.*, 2020). Estudos recentes indicam que a concentração de proAKAP4 no sêmen pode ser um marcador potencial para prever a fertilidade em bovinos, pois está fortemente associada à integridade estrutural e à funcionalidade espermática, especialmente em procedimentos de inseminação artificial utilizando sêmen congelado (MARTÍNEZ *et al.*, 2022). Essas descobertas têm implicações importantes para a pecuária, onde a seleção de touros com altos níveis de proAKAP4 pode otimizar os índices de fertilidade e, consequentemente, melhorar a eficiência reprodutiva do rebanho.

Além de sua função estrutural, a proAKAP4 está envolvida em processos bioquímicos que regulam a motilidade espermática através da ativação de cascatas de sinalização intracelular, que são essenciais para a capacitação e a reação acrossômica, eventos críticos para a fertilização (DORNIER *et al.*, 2021). A quantificação precisa dessa proteína no sêmen tem se mostrado uma ferramenta valiosa para identificar animais com maior potencial reprodutivo, possibilitando a seleção de doses de sêmen com maior probabilidade de sucesso na concepção (GARCÍA-MARTÍNEZ *et al.*, 2023). Dessa forma, a proAKAP4 surge como um biomarcador promissor que pode revolucionar as práticas de manejo reprodutivo na pecuária moderna, contribuindo para a maximização dos resultados produtivos.

O presente estudo teve como objetivo mensurar a concentração da proteína proAKAP4 do sêmen congelado de touros determinados como alta e baixa fertilidade testados a campo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Integridade de membrana plasmática

A membrana do espermatozoide é uma estrutura altamente especializada que desempenha um papel crucial na fertilização, regulando interações essenciais com o ovócito e facilitando a fusão celular e a ativação do embrião (Gadella, 2008). Os lipídios da membrana celular executam funções biológicas como armazenar moléculas nutritivas, fornecer energia e promover a integridade estrutural (ARRUDA *et al.*, 2011). A integridade da membrana espermática é essencial para a sobrevivência da célula, pois estabelece a homeostase celular e mantém as propriedades móveis. Esses requisitos são importantes para manter o potencial fertilizante dos espermatozoides. O diacetato de 6-carboxifluoresceína (DIC) é um corante que penetra na membrana plasmática dos espermatozoides. As enzimas no citoplasma do espermatozoide convertem as moléculas DIC em fluoresceína, produzindo uma fluorescência verde, demonstrando que a membrana plasmática do espermatozoide permanece intacta, pois as membranas danificadas não conseguem absorver esse corante.

O iodeto de propídio (IP) é um corante impermeável à membrana plasmática que tem afinidade por receptores presentes no DNA. Contudo, se a continuidade da membrana for quebrada, as moléculas de IP podem entrar na célula e ligar-se ao DNA e quando isso ocorre, é emitida fluorescência vermelha (HARRISON; VICKERS, 1990; ARRUDA *et al.*, 2011). Ao correlacionar DIC e IP, foi possível identificar três populações de espermatozoides. O verde é considerado intacto porque não há membrana plasmática danificada. E os corados de vermelho, são identificados como danificados, devido ao seu potencial de se ligar ao DNA. Já os lesados com acrossomas danificados apresentam as duas colorações, verde com núcleos vermelhos (HARRISON; VICKERS, 1990; ARRUDA *et al.*, 2011).

Harrison e Vickers (1990) adicionaram uma pequena quantidade de formaldeído à solução contendo a sonda e a amostra de sêmen para imobilizar os espermatozoides. Isto aumentou ainda mais a sensibilidade deste método na avaliação da integridade da membrana celular. SYBR-14 tem afinidade pelo DNA e capacidade de penetrar nas membranas celulares intactas. YO-PRO-1 também tem afinidade pelo DNA, mas a membrana do espermatozoide é impermeável ao corante. Estas duas sondas emitem fluorescência verde. Por esse motivo, eles nunca são usados juntos. Quando a membrana plasmática está intacta, as amostras coradas com SYBR-14 apresentam fluorescência, enquanto os experimentos com YO-PRO-1 não mostram fluorescência (Alvarez *et al.*, 2012; Martinez-Rodriguez *et al.*, 2012). O Hoechst 33342 é

utilizado como marcador celular, corando espermatozoides com membranas intactas, e pode ser empregado como marcador celular em estudos morfométricos de espermatozoides (Yaniz et al., 2012).

Os espermatozoides são envolvidos por completo pela membrana plasmática (PESCH; BERGMANN, 2006), estrutura celular que desempenha funções primordiais como manutenção da motilidade, capacitação espermática, reação acrossomal entre outras (TAPIA *et al.*, 2012). Durante o processo de congelamento, a membrana citoplasmática dos espermatozoides pode sofrer injúrias causadas por variações bruscas de temperatura (estresse térmico), formação de cristais de gelo e estresse osmótico, o que leva a alterações morfológicas e consequente perda da qualidade espermática (HEZAVEHI *et al.*, 2018). Alterações da composição fosfolipídica, permeabilidade hidráulica da membrana e tolerância osmótica limitada são algumas das alterações que podem ocorrer nas propriedades da membrana plasmática durante a criopreservação afetando a viabilidade do espermatozoide (HAMMERSTEDT *et al.* 1990; PARKS; LYNCH 1992; WOODS *et al.*, 2004; MOORE *et al.*, 2005; SIEME *et al.*, 2008).

O que indica o sucesso da criopreservação, visto que, espermatozoides são extremamente sensíveis às crio-injúrias é a avaliação das membranas espermáticas, pós-descongelamento. Assim, faz-se necessário a análise da integridade da membrana utilizado metodologias efetivas, como a utilização de sondas fluorescentes como Hoechst 33258, YoPro-1 e Iodeto de propídio (IP), que tem como característica a não penetração em membranas íntegras (ESTEVES *et al.*, 2000; MARTIN *et al.*, 2004; AURICH, 2005; SINGH, 2006). Dessa forma, quando ocorre a perda da integridade da membrana plasmática, essas sondas vão penetrar nas células danificadas e ligarem a DNA (por afinidade) ocorrendo a emissão de fluorescência.

Além de técnicas utilizando sondas não penetrantes, podem ser utilizados também corantes penetrantes para avaliação da membrana plasmática, como o diacetato de carboxifluoresceína (DCF) e o SYBR 14 (SILVA e GADELA 2006). Outra técnica que tem sido amplamente utilizada para diferenciação entre células com membrana plasmática lesada e intacta, é a associação entre sondas penetrantes e não penetrantes, sendo utilizado principalmente o DCF com IP e SYBR-14 com IP (GARNER *et al.*, 1986; ASSUMPÇÃO *et al.*, 2002; NAGY *et al.*, 2003).

2.2 Integridade de membrana acrossomal

Localizada na extremidade da cabeça do espermatozoide o acrossomo é uma organela que durante o processo de fertilização desempenha um importante papel na interação espermatozoide-óvulo. O acrossoma espermático tem sua estrutura circundada por fibras internas e membranas acrossomais externas (ABOU-HAILA;TULSIANI, 2000). Quando os espermatozoides se tornam capacitados, eles acabam desenvolvendo batimentos flagelares assimétricos e recebem a capacidade de que ocorra a reação acrossômica, o capacitando para a atividade fertilizadora. Casos de infertilidade estão relacionados a reação acrossômica anormal.

A capacitação espermática envolve uma cascata de eventos como aumento da atividade da Proteína Quinase A (PKA), remoção de colesterol, aumento da fluidez e hiperpolarização da membrana plasmática do espermatozoide, alterações na permeabilidade iônica (HERNADEZ GONZALEZ *et al.*, 2006; ARCELAY *et al.*, 2008; VISCONTI *et al.*, 2011). Estudos mostram que quando ocorre o bloqueio de PKA, a reação acrossômica não ocorre, o que pode estar relacionado pela inibição de processos que estão ligados a competência exocitótica acrossomal (VISCONTI *et al.*, 1995), demonstrando que essa quinase é responsável por coordenar a maior parte dos eventos relacionado a capacitação.

A análise da integridade do acrossoma é fundamental devido ao seu papel crucial no processo reprodutivo. Técnicas que utilizam sondas fluorescentes são amplamente empregadas para avaliar essa integridade (Silva & Guerra, 2012). Lectinas, como *Pisum sativum* agglutinin (PSA) e *Arachis hypogaea* agglutinin (PNA), conjugadas a essas sondas, interagem com glicoproteínas da membrana acrossomal, permitindo a detecção de lesões por meio de coloração específica (Silva & Gadella, 2006).

2.3 Potencial mitocondrial

As mitocôndrias são organelas conhecidas por desempenhar o papel de fornecedor de energia celular na forma de adenina trifosfato (ATP), além de contribuir para a homeostasia celular e apoptose (HERST *et al.*, 2017). Transformações redox associadas à atividade do ciclo de Krebs resulta no potencial mitocondrial, importante para armazenar energia e ser utilizada na produção de ATP (ZOROVA *et al.*, 2018).

Durante o processo de espermatogênese quase todo o citoplasma é eliminado, contudo as mitocôndrias ainda ficam presentes nos espermatozoides maduros (ZHANG *et al.*, 2019). Assim, as mitocôndrias são quem fornecem energia necessária para a motilidade dos

espermatozoides, hiperativação, capacitação e reação acrossômica espermática, e assim realizar uma fertilização bem sucedida (DURAIRAJANAYAGAM *et al.*, 2021). A síntese local de proteínas nos espermatozoides é facilitada, devido a mitocôndria do esperma possuir genoma próprio, DNA mitocondrial e ribossomos específicos (ST JOHN *et al.*, 2010). Entretanto, eventos que levam o comprometimento de funções mitocondriais, bem como alterações no genoma mitocondrial pode levar a uma disfunção espermática a afetar a fertilidade (AMARAL *et al.*, 2013).

A avaliação do potencial mitocondrial correlaciona-se com o potencial energético da célula espermática e a motilidade. Para o monitoramento do potencial mitocondrial são utilizados alguns tipos de sondas fluorescentes como Rhodamie 123 (GRAHAM *et al.*, 1990), Mito Tracker Green (GILLAN *et al.*, 2005) e iodeto de 5,5',6,6'-tetrachloro-1,10,3,30-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) (GARNER *et al.*, 1997).

O princípio de atuação da Rhodamina 123 e do Mito se baseia na formação de gradiente de próton na membrana mitocondrial interna (SILVA; GADELLA, 2006), onde as sondas fluorescentes são transportadas e acumuladas dentro das mitocôndrias ativas, e após sua ligação à membrana mitocondrial interna emitem fluorescência, sendo sondas seletivas de mitocôndrias funcionais (HOLT, 2000; SILVA *et al.*, 2009). Já o princípio de atuação de JC-1 está relacionado com as mudanças de polarização da membrana interna (SILVA; GADELLA, 2006), necessitando de um potencial de membrana negativo para penetrar na mitocôndria e emitir fluorescência, por ser um corante que depende do gradiente eletroquímico (ARRUDA *et al.*, 2007).

2.4 Avaliação computadorizada da cinética espermática

A análise da motilidade espermática desempenha um papel central na andrologia, sendo considerada, ao longo do tempo, um fator crucial na avaliação e predição da capacidade fecundante dos machos. Estudos demonstram que a motilidade dos espermatozoides é um dos principais indicadores de qualidade seminal e, portanto, é amplamente utilizada como parâmetro para estimar o potencial reprodutivo (Amann & Katz, 2004; Mortimer, 1997). Esta avaliação foi e ainda é amplamente utilizada por microscopia óptica com amostra entre lamina e lamínula, porém a análise é visual onde estima-se um valor de 0 a 100% para as células móveis no campo, ou seja, avaliação de caráter subjetivo. A desvantagem da técnica subjetiva se dá a variações que podem alcançar até 60% entre as análises (MATOS, 2008). Nota-se a permanência do método subjetivo devido a maior utilização a campo e pequenos centros onde

os recursos possam ser mais escassos e que não atinjam o custo benefício de equipamentos aos quais tem objetividade da análise.

Tecnologias para análise objetiva da avaliação de motilidade espermática são datadas desde a década de 40 com recursos de fotografia e determinação manual da velocidade de deslocamento da célula (VERSTEGEN *et al.*, 2002; AMANN E KATZ, 2004). Com o avanço das tecnologias, surgiu o sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis), que consiste em uma plataforma automatizada para a captura e digitalização de imagens consecutivas de espermatozoides. Este sistema permite o processamento detalhado e a análise precisa da cinética individual das células espermáticas, além de possibilitar a realização de análises estatísticas robustas em grupos populacionais (AMANN; KATZ, 2004).

As avaliações e parâmetros de cinética espermática são discutidos em detalhes por Verstegen (2002, apud Matos, 2008), destacando-se os seguintes indicadores:

Velocidade curvilínea (VCL- $\mu\text{m/s}$): É a velocidade da trajetória real do espermatozóide. É sempre a maior das três velocidades e serve como elemento de cálculo para a linearidade.

Velocidade linear progressiva (VSL- $\mu\text{m/s}$): É a velocidade média em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozóide. É sempre a mais baixa das três velocidades.

Velocidade média da trajetória (VAP- $\mu\text{m/s}$): é a velocidade da trajetória média do espermatozóide. Em casos onde a trajetória da cabeça espermática é muito regular e linear com pouco movimento lateral da cabeça, a VAP é quase a mesma que a VSL, porém com trajetórias irregulares, não lineares ou onde existe um alto grau de movimento lateral, a VAP será maior que a VSL.

Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH - μm): é a amplitude do deslocamento médio da cabeça do espermatozóide em sua trajetória real. A mensuração desse parâmetro está relacionada com a capacidade de penetração na zona pelúcida do óvulo, assim, a ALH é um dos parâmetros que tem efeito sobre a fertilização.

Frequência de batimento flagelar cruzado (BCF- Hz): É o número de vezes que a cabeça do espermatozóide cruza a direção do movimento. Se existem mais batimentos/segundos que imagens/segundos, então, a BCF irá ser subestimada.

Retilinearidade (STR - %): É a relação percentual entre VSL e VAP. Estima a proximidade do percurso da célula a uma linha reta.

Linearidade (LIN - %): Relação percentual entre VSL e VCL, ou seja, é a porcentagem de célula que tem index linear > 0.7 , ângulo absoluto menor que 25° e ângulo algébrico menor que 3° .

2.5 Programas a campo de fertilidade de touros

Apesar da constante utilização de avaliações dos parâmetros seminais como integridade de membrana, acrossoma, potencial mitocondrial, motilidade, morfologia espermática,

fragmentação de DNA entre outros, ainda assim estes resultados podem ser insuficientes para determinação da fertilidade do ejaculado, uma vez que, o processo de fecundação é dependente de diversos fatores onde entre eles temos capacitação espermática e reação acrossômica (NOGUEIRA, 2019). Nota-se que apesar da quantidade e qualidade de diversas avaliações espermáticas não há ainda um teste laboratorial que isoladamente possa determinar a capacidade fecundante de um ejaculado (ARRUDA, 2023), porém consegue-se prever o potencial fecundante (NOGUEIRA, 2019). Diante das incertezas na determinação da capacidade fecundante das amostras seminais, empresas do setor de melhoramento genético e comercialização de sêmen congelado adotaram programas de fertilidade a campo. Esses programas são essenciais para identificar reprodutores com maior potencial reprodutivo, permitindo a seleção daqueles que demonstram melhores condições de gerar descendentes e, assim, alcançar índices superiores de concepção.

Os programas de fertilidade a campo são baseados em amplo estudo estatístico onde a taxa de prenhes e concepção dos touros utilizados como doador de sêmen são avaliados, com observação e respaldo da informação sobre escore corporal das fêmeas, categoria (novilha, piriúpara, múltipara, pluripara e solteira) e outros fatores extrínsecos aos reprodutores, afim de excluir os efeitos que interferem sobre a real capacidade fecundante. Após avaliados são categorizados pela sua eficiência de resultado, ou seja, porcentagem de prenhes a campo. É importante salientar que os dados das inseminações artificiais se compreendem geralmente de dados de IATF, onde as análises de diversos pontos na fazenda são consideradas para que essas variáveis não influenciem na resposta do touro.

Os programas de fertilidade a campo trazem fontes de dados imprescindíveis para estudo e possibilidade da predição de fertilidade de touros. Este banco de dados tem importante impacto para as correlações das avaliações individuais dos parâmetros espermáticos e a predição de fertilidade. Dentro do mercado brasileiro são conhecidos os programas de fertilidade a campo das empresas CRV Lagoa com o programa IFERT, onde em 2019 foram utilizados dados de 200.000 IATFs e 814 reprodutores (NOGUEIRA, 2019). Outra empresa do segmento de melhoramento genético a Alta Genetics do Brasil detém o programa Concept Plus que recebeu 2.600.000 dados de IATFs no ano de 2023 (CONCEPT PLUS, 2023). Os programas de fertilidade a campo trazem consistentes dados para pesquisadores que buscam encontrar biomarcadores da fertilidade pois podem ser relacionados

2.6 Biomarcador de qualidade espermática e fertilidade

Além do PROAKP4, várias outras proteínas têm sido estudadas como potenciais marcadores de fertilidade, incluindo a osteopontina, a prostaglandina D sintase, a P25b e a clusterina.

A osteopontina (OPN) é uma glicoproteína multifuncional, rica em ácido aspártico, que desempenha papéis essenciais em diversos processos fisiológicos (Cunha Bustamante-Filho et al., 2020). A OPN tem a capacidade de interagir com proteínas de membrana, facilitando a comunicação intracelular (D'OCCHIO et al., 2020). Estudos *in vitro* demonstraram que o tratamento de espermatozoides congelados com OPN pode aumentar as taxas de fertilização e o desenvolvimento embrionário em bovinos (GONÇALVES et al., 2008; MONACO et al., 2009), búfalos (BOCCIA et al., 2013) e suínos (HAO et al., 2008).

Embora pouco se saiba sobre o papel biológico da prostaglandina D sintase do tipo lipocalina (PGDS) no sistema reprodutivo masculino, ela já foi identificada como uma proteína associada à fertilidade no plasma seminal, sendo também detectada em testículos de touro e em espermatozoides ejaculado (GERENA et al., 1998). Estudos em camundongos sugerem que a PGDS possa estar relacionada à maturação espermática, dado que é encontrada no tecido intersticial testicular, nas células de Sertoli e na cauda do epidídimo (GERENA et al., 1998). Além disso, Gonçalves e colaboradores (2008) mostraram que a PGDS pode estar associada à zona pelúcida, observando uma redução nas concentrações dessa proteína nos fluidos da tuba uterina de vacas após a fertilização *in vitro*.

Considerada um marcador de fertilidade em bovinos, a P25b é uma proteína ancorada à membrana espermática que cobre o acrossoma, sendo classificada como um glicosilfosfatidilinositol (GPI) (FRENETTE & SULLIVAN, 2001). Proteínas ortólogas à P25b, como a P34H no homem (BOUÉ et al., 1996) e a P31m no macaco (LAMONTAGNE et al., 2001), também foram identificadas em outras espécies animais. Devido à sua semelhança com a P34H em humanos e sua localização nos espermatozoides, é provável que a P25b esteja envolvida nas interações entre espermatozoides e a zona pelúcida (SULLIVAN, 2004).

A clusterina, também conhecida como Apolipoproteína J, é uma glicoproteína multifuncional que desempenha papéis variados, especialmente no sistema reprodutivo humano (JANISZEWSKA et al., 2021). Presente no epidídimo de diversas espécies, assim como no testículo bovino, no plasma seminal, e na membrana dos espermatozoides bovinos e humanos (PALMER & CHRISTIE, 1992; FOUCHECOURT et al., 2000; HOWES et al., 1998), a clusterina está envolvida na liquefação do sêmen por meio de interações com o inibidor de protease epididimal na superfície dos espermatozoides (TROUGAKOS, 2013).

2.7 ProAKAP4

ProAKAP4 é uma proteína estrutural e funcional específica dos espermatozóides, sendo codificado por um único gene **AKAP4** localizado no cromossomo X em mamíferos, o gene estando ligado ao X codifica uma proteína precursora denominada proAKAP4 e corresponde à proteína completa AKAP4 (JOHNSON, *et al.*, 2007; DELEHEDDE, *et al.*, 2019). O precursor proAKAP4 deve ser processado para liberar a proteína AKAP4 funcional, que por sua vez é integrada na bainha de tecido fibroso da peça principal do flagelo juntamente com outros componentes da bainha filamentosa, como as proteínas 1 e 2, que interagem com a bainha filamentosa. O AKAP4 maduro então recruta a proteína holoenzima quinase A (PKA) para a cápsula filamentosa e facilita a fosforilação local de substratos para regular a função flagelar e a motilidade dos espermatozóides (DELEHEDDE, *et al.*, 2019).

As proteínas da família AKAP4 (Proteínas de ancoragem A-quinase) promovem a base molecular para a funcionalidade espermática e são responsáveis por coordenar e mediar o sinal de transdução, ativação dos receptores de superfície celular, regulação e terminação das vias de sinalização para as atividades de motilidade, capacitação e fertilidade. (BOERSMA, 2022; DELEHEDDE, 2019). Estas proteínas são essenciais na formação e estruturação da bainha fibrosa do flagelo que circundam o axonema e compõe maior parte da constituição deste segmento da célula espermática e está presente dentre todas as espécies de mamíferos incluindo touros. (DORDAS-PERPINYÀ, *et al.*, 2022 e MALO *et al.*, 2021).

Estruturalmente a proAKAP4 é expressada como proteína precursora e deve ser convertida por clivagem proteolítica em proteína AKAP4 amadurecida. Este processo de conversão ocorre durante a espermatogênese na fase celular de espermátide e somente em células vivas e móveis. A falta de conversão da proAKAP4 é encontrada em modelos transgênicos invalidados para o transporte intraflagelar das proteínas 81 e 174 nas quais causam defeitos na espermiogênese e infertilidade do macho (MALO *et al.*, 2021). A exclusão destas proteínas resulta na má formação da bainha fibrosa como também displasia flagelar resultando em infertilidade devido as anormalidades morfológicas e a perda da motilidade. O conjunto completo de proAKAP4 em cada espermatozoide individual é produzido antes da ejaculação porque os espermatozoides são transcricionalmente inativos. Em contraste, a quantidade de AKAP4 será modulada pelo conjunto inicial de proAKAP4 e pelo seu estado metabólico. Assim, qualquer evento defeituoso durante a espermatogênese terá impacto na expressão do precursor proAKAP4 (DORDAS-PERPINYÀ *et al.* 2022).

Outro importante ponto relatado por autores como Delehedde (2019) e Kowalczyk (2022), são as correlações positivas das concentrações de proAKAP4 com a qualidade seminal e indicadores de fertilidade em mamíferos de grande e pequeno porte e como a mensurações da concentração desta proteína demonstram informações importantes em relação a preservação da qualidade biológica do sêmen e a capacidade fecundante do macho.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de sêmen congeladas utilizadas nesta pesquisa, foram coletadas de reprodutores bovinos da raça nelore alojados em piquetes individuais com sombreamento natural e artificial, com alimentação balanceada no cocho duas vezes ao dia, e acesso livre a água e suplementação mineral.

A coleta de sêmen e o processamento das doses congeladas seguiram os procedimentos de rotina da central de coleta e processamento de sêmen Alta Genetics do Brasil LTDA. Foram utilizados dois grupos de touros onde foram selecionados e classificados como alta fertilidade (n=5) e baixa fertilidade (n=5) segundo programa de fertilidade a campo CONCEPT PLUS® da empresa Alta Genetics do Brasil. O programa de fertilidade é embasado em resultados de IATF pelas informações de prenhez a campo e pelas avaliações estatísticas que excluem outros efeitos que interferem na fertilidade e identifica isoladamente os reprodutores e sua contribuição as taxas de concepção.

Foram utilizadas 32 partidas de sêmen destes reprodutores de alta e baixa fertilidade onde todos os doadores de sêmen tiveram no mínimo duas partidas avaliadas. Para determinação do critério de alta e baixa fertilidade dos 10 touros utilizados para o presente estudo, foram utilizadas informações de 89.899 inseminações e 624 fazendas aos quais são referentes a estação reprodutiva de 2018/2019 e 2019/2020 da base de dados do programa CONCEPT PLUS® no qual alcançou em 2020 o total 1.909.000 inseminações em 1933 fazendas relacionando-se com 300 equipes a campo.

As amostras avaliadas foram correlacionadas segundo a classificação em alta e baixa fertilidade e as avaliações de citometria de fluxo para integridade de membrana plasmática, integridade acrossomal, cinética espermática por avaliação computadorizada e a concentração da proteína proAKAP4 através do o kit comercial Bull 4MID® Kit (proAKAP4 marker) - 4BioDx.

3.1 Avaliação por citometria de fluxo

Os procedimentos de citometria de fluxo foram realizados utilizando o equipamento CytoFLEX™ (Beckman Coulter, Brea, Califórnia, EUA) equipado com laser azul (488 nm, 100 mW), vermelho (640 nm, 40 mW) e violeta (405 nm, 100 mW) e os dados foram analisados por meio do software CytExpert Acquisition (Beckman Coulter, Brea, Califórnia, EUA). Para a leitura no citômetro de fluxo, todas as amostras de sêmen foram diluídas a uma concentração

de 1×10^6 espermatozoides mL^{-1} em solução tampão TALP-PVA (100 mM NaCl, 3,1 mM KCl, 25,0 mM NaHCO_3 , 0,3 mM NaH_2PO_4 , 21,6 mM DL 60% de lactato de sódio, 2,0 mM de CaCl_2 , 0,4 mM de MgCl_2 , 10,0 mM de Hepes, 1,0 mM de piruvato de sódio e $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de álcool polivinílico-PVA) de acordo com Carneiro et al. (2018), seguido de 20 μL (2,2 mM) de Hoechst 33342 (H33342; Thermo Scientific, Fisher, IL, EUA – H1399).

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática e integridade acrossomal foram utilizadas, respectivamente, a sonda fluorescente iodeto de propídio (PI; Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA – P4170) e a sonda aglutinina de amendoim conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC-PNA; Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA L7381). Para a avaliação do potencial mitocondrial, foi utilizada a sonda fluorescente MitoStatus Red (MST; BD Pharmingen™), cuja emissão de fluorescência indica o alto potencial da membrana mitocondrial., de acordo com Freitas-Dell'Aqua et al. (2012).

A uma alíquota da amostra previamente descrita, foram adicionados 2 μL de iodeto de propídio (PI) a uma concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, 2 ng de FITC-PNA (1 mg/mL) e 0,2 μL de MitoStatus Red (20 nM). A mistura foi então incubada por 20 minutos a 37°C , em condições de escuridão. Após a incubação, as amostras foram avaliadas quanto à emissão de fluorescência utilizando citometria de fluxo, com a quantificação dos resultados apresentada em gráficos de dot plot. Células consideradas intactas não apresentaram coloração pelos reagentes, sendo que células PI negativas foram classificadas como vivas e células FITC-PNA negativas como possuidoras de acrossoma intacto. O potencial mitocondrial foi avaliado com base na intensidade de fluorescência emitida pelo MitoStatus Red, onde células com alto potencial mitocondrial foram fortemente coradas, enquanto aquelas com baixo potencial apresentaram coloração fraca, sendo essa avaliação realizada por meio de histogramas. Em cada ensaio, foram analisadas pelo menos 10.000 células por citometria de fluxo.

3.2 Avaliação da cinética espermática

A avaliação da motilidade espermática subjetiva foi avaliada através do processo da central de coleta e processamento de sêmen com a utilização de microscopia optica com amostra pipetada no volume de 10 μL entre lamina e lamínula e avaliada em aumento de 400x.

A cinética espermática foi avaliada de forma objetiva pelo sistema computadorizado SCA® (Sperm Class Analyzer, Microptic, Barcelona, Espanha). Para a avaliação da mesma, 5,0 μL da amostra de sêmen foi colocada na câmara de Makler® (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) previamente aquecida a 37°C e o aparelho calibrado conforme as recomendações

do fabricante para análise de sêmen bovino. Avaliaram-se, aleatoriamente, no mínimo cinco campos por amostra, quanto aos seguintes parâmetros de cinética espermática: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %) e rápidos (%).

3.3 Avaliação da concentração de proAKAP4

Foi utilizado para avaliação da concentração de proAKAP4 o kit comercial Bull 4MID® Kit (proAKAP4 marker) - 4BioDx. O kit refere-se a um ensaio de ELISA sanduíche quantitativo para determinação da concentração do biomarcador proAKAP4 em amostras de sêmen. O kit comercial de ELISA tipo sanduíche é composto por uma placa de 96 poços, cada um revestido com anticorpo monoclonal específico para a proteína proAKAP4. As amostras seminais são primeiro sujeitas a lise celular e, em seguida, adicionadas aos poços da placa. A proAKAP4 presente nas amostras é capturada pelo anticorpo monoclonal adsorvido nas superfícies dos poços. Após a incubação, um anticorpo secundário, conjugado covalentemente à peroxidase de raiz forte (HRP), é adicionado para detectar a proAKAP4. A presença da proteína é então revelada por uma reação enzimática que produz uma coloração detectável, permitindo a quantificação da proAKAP4 nas amostras. Realiza-se a adição de uma solução de substrato a cada poço para coloração da amostra na qual sua intensidade é dependente da quantidade de proAKAP4. Após a coloração se utiliza uma solução de inativação da atividade da peroxidase para que seja realizada a mensuração por espectrofotometria a 450 nm.

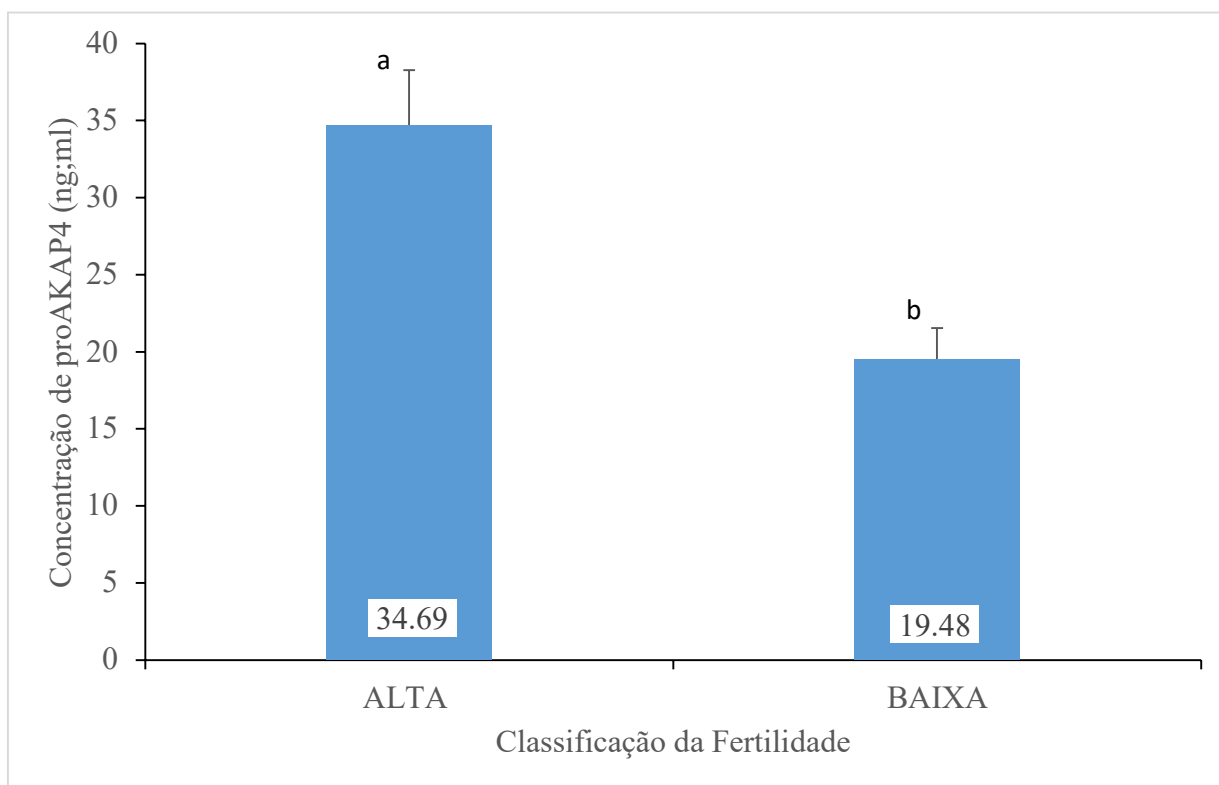
3.4 Avaliação Estatística

Os dados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Levene para testar a normalidade e homogeneidade, respectivamente. As relações e efeitos entre as concentrações de proAKAP4 e o status de fertilidade, cinética, morfologia, integridade de membrana e potencial mitocondrial foram analisados por meio do procedimento GLIMMIX (SAS® 9.3, Inc., Cary, NC, EUA), considerando a classe de fertilidade do touro como variável dependente. Todos os resultados são expressos como média e EPM, com $p < 0,05$ considerado significativo.

4 RESULTADOS

Touros de alta fertilidade apresentam uma maior concentração de proAKP4 no sêmen do que aqueles com baixa fertilidade ($34,69 \pm 3,57$ ng/ 10^6 ; $19,48 \pm 2,06$ ng/ 10^6 espermatozoides, respectivamente) (Gráfico 1). Além disso, observou-se que os touros de alta fertilidade exibem uma proporção maior de membrana plasmática íntegra ($65,83\% \pm 2,28$) em comparação com os classificados como baixa fertilidade ($56,37\% \pm 2,12$; $p = 0,0052$; Tabela 1).

GRÁFICO 1 – Gráfico da média de concentração de proAKAP4 para amostras de sêmen congelado de touros alta e baixa fertilidade em ng/ 10^6 ($p < 0,05$).



As análises simultâneas de membrana plasmática lesionada e acrossoma íntegro (MPLAcI) demonstraram valores menores nos touros de alta fertilidade ($21,2\% \pm 1,23$) em comparação com os de baixa fertilidade ($26,53\% \pm 1,7$; $p = 0,0151$; Tabela 1). No que diz respeito à análise da membrana plasmática íntegra associada ao potencial mitocondrial (PI-MS+), os touros de alta fertilidade apresentaram resultados superiores ($49,72\% \pm 2,23$) em relação ao grupo de baixa fertilidade ($42,64\% \pm 1,75$; $p = 0,0205$; Tabela 1).

Tabela 1 – Avaliação citometria de fluxo de sêmen congelado de touros alta e baixa fertilidade.

Parâmetros Espermáticos	ALTA	BAIXA	p
IMP	65,83%±2,28	56,37%±2,12	0,0052
MPLAcR	24,8%±1,59	23,22%±1,32	0,4603
MPLAcI	21,2%±1,23	26,53%±1,7	0,0151
MPIAcI	53,53%±2,29	47,35%±1,98	0,0538
MPIAcR	2,26%±1,79	2,88%±2,46	0,8374
PI+MS+	4,11%±0,59	6,5%±1,46	0,1246
PI+MS-	41,89%±2,02	42,92%±2,15	0,7311
PI-MS-	4,25%±0,3	10,04%±4,14	0,148
PI-MS+	49,72%±2,23	42,64%±1,75	0,0205

IMP – membrana plasmática íntegra. MPLAcR – Membrana plasmática lesionada e acrossoma reagido; MPLAcI – Membrana plasmática lesionada e acrossoma íntegro; MPIAcI – Membrana plasmática íntegra e acrossoma íntegro; MPIAcR – Membrana plasmática íntegra e acrossoma reagido; PI+MS+ - Membrana plasmática lesionada e alto potencial mitocondrial; PI+MS- - Membrana plasmática lesionada e baixa potencial mitocondrial; PI-MS- - Membrana plasmática íntegra e baixo potencial mitocondrial; PI-MS+ - Membrana plasmática íntegra e alto potencial mitocondrial. (P<0,05).

Na análise subjetiva das amostras, foi observado um padrão similar para motilidade e vigor, onde os touros de alta fertilidade apresentaram melhores resultados ($51,18\% \pm 1,32$ e $4,53 \pm 0,12$; $p = 0,0025$; Tabela 2) em comparação com os de baixa fertilidade ($46\% \pm 0,72$ e $4,13 \pm 0,09$; $p = 0,0178$; Tabela 2), respectivamente. Em relação à avaliação cinética, foi notada uma menor presença de células não progressivas nos touros de alta fertilidade em comparação com os de baixa fertilidade ($59,39\% \pm 2,04$ e $65,54\% \pm 1,87$; $p = 0,0358$; Tabela 2), enquanto o oposto foi observado para as células progressivas ($30,78\% \pm 1,85$ e $25,29\% \pm 1,55$; $p = 0,0331$; Tabela 2). Quanto ao parâmetro de velocidade média, foi evidenciado que animais classificadas como baixa fertilidade apresentaram uma maior proporção ($29,99\% \pm 1,21$) em comparação com os de alta fertilidade, que registraram ($25,48\% \pm 1,47$; $p = 0,0274$; Tabela 2). Os touros de alta fertilidade apresentaram menores volumes de defeitos espermáticos de classificação menor em comparação com os touros de baixa fertilidade ($2,47\% \pm 0,24$ vs. $5,46\% \pm 1,03$; $p = 0,0055$).

Em contrapartida, a quantidade de células normais foi maior nos touros de alta fertilidade ($91,82\% \pm 0,83$) em relação aos de baixa fertilidade ($88,46\% \pm 1,03$; $p = 0,0159$).

Tabela 2 – Avaliação motilidade, vigor de forma subjetiva por microscopia óptica, cinética computadorizada do sêmen descongelado e morfologia espermática de touros alta e baixa fertilidade ($P < 0,05$).

Patametros Espermáticos	ALTA	BAIXA	p
Motilidade	$51,18\% \pm 1,32$	$46\% \pm 0,72$	0,0025
Vigor	$4,53 \pm 0,12$	$4,13 \pm 0,09$	0,0178
Não progressivas	$59,39\% \pm 2,04$	$65,54\% \pm 1,87$	0,0358
Progressivas	$30,78\% \pm 1,85$	$25,29\% \pm 1,55$	0,0331
Rapidas	$47,79\% \pm 3,8$	$39,21\% \pm 2,7$	0,0828
Medias	$25,48\% \pm 1,47$	$29,99\% \pm 1,21$	0,0274
Lentas	$24,08\% \pm 3,77$	$21,62\% \pm 1,34$	0,5645
Estáticas	$12,36\% \pm 3,10$	$9,16\% \pm 2,08$	0,4113
Morfologia Espermática			
Defeitos Maiores	$5,7\% \pm 0,74$	$6,06\% \pm 0,52$	0,7006
Defeitos Menores	$2,47\% \pm 0,24$	$5,46\% \pm 1,03$	0,0055
Normais	$91,82\% \pm 0,83$	$88,46\% \pm 1,03$	0,0159

5 DISCUSSÃO

No presente experimento com touros Nelore, as concentrações de proAKAP4 variaram entre 5,51 e 76,36 ng/10⁶, valores similares aos encontrados por Delehedde et al. (2019) em touros da raça holandesa (15,15 a 80,2 ng/10⁶). Dordas-Perpinyà et al. (2022) também encontraram valores para raça holandesa entre 19,96 e 96,95 ng/10⁶. Almeida et al. (2022) identificaram concentrações de proAKAP4 para sêmen de touros da raça Nelore entre 12,21 e 48,28 ng/10⁶, valores mais baixos que o presente estudo, porém sem estratificar os animais em grupos extremos de fertilidade no campo.

O presente estudo reporta, pela primeira vez na literatura, que a concentração de proAKAP4 no sêmen serve como provável indicador de fertilidade a campo em programas de inseminação artificial. Observou-se que touros de alta fertilidade apresentam maiores concentrações de proAKAP4 no sêmen, estabelecendo-se, assim, como um biomarcador seminal relevante para prenhez a campo. Adicionalmente, foi identificada uma correlação positiva significativa entre a concentração de proAKAP4 e a motilidade espermática em bovinos nelore, corroborando achados prévios em bovinos taurinos (Delehedde et al., 2019) e zebuínos (Almeida et al., 2022). Este fenômeno é atribuível ao papel crucial da AKAP4 na coordenação dos sinais de transdução que regulam a função espermática, incluindo a motilidade (Malo et al., 2021). Camundongos transgênicos deficientes em proAKAP4/AKAP4 exibem espermatozoides imóveis e infertilidade (Fang et al., 2019; Xu et al., 2020). Além da função estrutural, as proteínas da família da ancoragem A quinase fornecem a base molecular para a funcionalidade espermática (Boersma et al., 2022; Delehedde et al., 2019). As AKAPs facilitam a ancoragem e o recrutamento da proteína quinase A, que está envolvida na fosforilação do AMP cíclico (AMPC) (Turner, 1998). O AMPC atua na ativação de enzimas e respostas celulares, desempenhando um papel essencial no metabolismo celular e na produção de energia mitocondrial, esta ação foi demonstrada através de técnicas como radioimunoensaio (RIA) para medir os níveis de AMPC, ensaios de atividade da PKA para avaliar a fosforilação de proteínas, e medições da produção de ATP para analisar a função mitocondrial (Stryer, 2013).

A observação de que touros altamente férteis exibem maior motilidade, vigor e motilidade progressiva valida o modelo de seleção de fertilidade para reprodução em campo. Já os touros determinados como baixa fertilidade pelo mesmo programa, mesmo estando de acordo com os parâmetros do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), podem ser considerados subférteis, evidenciando as limitações dos exames laboratoriais atuais na predição

da fertilidade em condições de campo (Berry et al., 2014). Isso justifica a necessidade contínua de pesquisa em busca de novos métodos ou biomarcadores que auxiliem na predição mais precisa da fertilidade.

O sêmen de animais que apresentam maior prenhez a campo, possuem maior integridade de membrana plasmática, sendo quase 17% a mais a quantidade de células íntegras, dados que corroboram para o papel crucial da proAKAP4 na manutenção da integridade da membrana plasmática dos espermatozoides. Segundo Jumeau et al. (2017), esta proteína é essencial para a organização do citoesqueleto e a formação de estruturas flagelares, contribuindo para a estabilidade e funcionalidade da membrana. Turner (2008) também destaca que a presença adequada de proAKAP4 está associada a uma maior resistência da membrana plasmática impedindo danos durante o transporte e a fertilização. Adicionalmente, Soler et al. (2019) correlacionam a proAKAP4 com a qualidade do sêmen, reforçando sua importância estrutural.

Thomson et al. (2009) encontraram que touros com maior porcentagem de espermatozoides com membranas intactas apresentavam significativamente maiores taxas de prenhez após inseminação artificial. De forma semelhante, Amann et al. (2000) destacaram que a integridade de membrana plasmática é um indicador crucial da viabilidade do espermatozóide, com touros que possuem baixa integridade de membrana e apresentando menores taxas de prenhez. Silva et al. (2019) reforçaram essa correlação positiva ao encontrar que a integridade da membrana plasmática está fortemente associada à eficiência reprodutiva em touros Nelore, indicando que a manutenção da integridade da membrana é essencial para o sucesso reprodutivo.

As lesões na membrana plasmática dos espermatozoides podem ser resultado de diversas causas, tais como estresse oxidativo, criopreservação e defeitos intrínsecos. O estresse oxidativo, desencadeado por um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a capacidade antioxidante, configura-se como uma das principais razões das lesões na membrana plasmática. As ERO têm a capacidade de danificar lipídios, proteínas e DNA, comprometendo a funcionalidade dos espermatozóides (Aitken et al., 2012). Paralelamente, no processo de congelamento e descongelamento durante a criopreservação, danos físicos e químicos à membrana plasmática podem ocorrer em decorrência da formação de cristais de gelo intracelular e da desidratação celular (Watson, 2000). Modificações na composição lipídica ou proteica da membrana plasmática, frequentemente associadas a defeitos genéticos ou de desenvolvimento, também podem aumentar a suscetibilidade a danos (Holt, 2000).

A avaliação da integridade da membrana plasmática com o iodeto de propídeo (PI) constitui uma técnica fundamental na análise da qualidade espermática. O PI, um corante fluorescente,

tem a característica exclusiva de se ligar ao DNA, penetrando apenas em células com membranas plasmáticas lesadas. Assim, células saudáveis com membranas íntegras permanecem não fluorescentes, enquanto células lesionadas emitem fluorescência sob luz ultravioleta. Esse princípio torna o PI uma ferramenta valiosa para diferenciar espermatozoides viáveis e não viáveis (Garner & Johnson, 1995). Estudos conduzidos por Thomson et al. (2009), Amann et al. (2000) e Silva et al. (2019) estabelecem uma correlação significativa entre a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides e as taxas de prenhez após a inseminação artificial, sugerindo que a preservação da integridade da membrana é essencial para o sucesso reprodutivo.

O presente estudo revela que touros de alta fertilidade exibem uma baixa incidência de defeitos menores e uma elevada proporção de células normais. Esses animais apresentam uma maior concentração de proAKAP4 no sêmen, conforme observado por Bastan e Akcay (2021), que identificaram uma correlação negativa entre a concentração de proAKAP4 e a prevalência de células alteradas ao testar grupos com diferentes concentrações de proAKAP4. A redução na quantidade de proAKAP4 está associada a alterações no flagelo, diminuindo seu diâmetro e causando defeitos menores relacionados à cauda do espermatozoide (Fang et al., 2019). Estudos demonstram que ratos nocauteados para o gene da AKAP4 não apresentam bainha fibrosa, e a peça principal do flagelo possui diâmetro reduzido (Fang et al., 2019), o que explica a menor motilidade espermática observada tanto no presente estudo quanto em outros (Delehedde et al., 2019; Almeida et al., 2022).

Além de sua função estrutural, as proteínas da família das AKAPs (*A-kinase anchoring proteins*) fornecem a base molecular para a funcionalidade espermática (Boersma et al., 2022; Delehedde et al., 2019). As AKAPs facilitam a ancoragem e o recrutamento da proteína quinase A, essencial na fosforilação do AMP cíclico (cAMP) (Turner, 1998). O cAMP, por sua vez, ativa enzimas e respostas celulares, desempenhando um papel crucial no metabolismo celular e na produção de energia nas mitocôndrias (Nixon et al., 2019). Esta associação é evidenciada no presente estudo pela avaliação do potencial mitocondrial, onde touros de alta fertilidade demonstraram maior ativação das organelas energéticas, maior concentração de proAKAP4 e melhores resultados de prenhez a campo.

O potencial mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) é um indicador fundamental da qualidade e fertilidade dos espermatozoides de touros. Estudos recentes demonstram uma associação significativa entre $\Delta\Psi_m$ e a capacidade fertilizante dos espermatozoides. Amaral et al. (2018) destacaram que touros com espermatozoides apresentando $\Delta\Psi_m$ elevado possuem maior motilidade e

viabilidade, características essenciais para a fertilização bem-sucedida. Além disso, Paoli et al. (2019) revelaram que $\Delta\Psi_m$ é um parâmetro crítico na seleção de espermatozoides para técnicas de reprodução assistida, como a fertilização in vitro (FIV), mostrando uma correlação positiva entre $\Delta\Psi_m$ e taxas de fertilização. Silva et al. (2020) investigaram a relação entre $\Delta\Psi_m$ e a integridade do DNA espermático, descobrindo que espermatozoides com $\Delta\Psi_m$ elevado tendem a ter menos danos no DNA, o que é crucial para a transmissão genética estável e o desenvolvimento embrionário saudável. Esses estudos reforçam a importância de $\Delta\Psi_m$ como um marcador de qualidade espermática e fertilidade em touros.

6 CONCLUSÃO

A concentração de proKAP4 é maior em sêmen de touros de alta fertilidade em programa de inseminação à campo, proporcionando sêmen de maior qualidade observado por maior motilidade, vigor, proporção de células normais, integridade de membrana, ativação mitocondrial e menor quantidade de defeitos.

REFERÊNCIAS

- ABOU-HAILA, A.; TULSIANI, D. R.P. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 379, n. 2, p. 173-182, 2000.
<https://doi.org/10.1006/abbi.2000.1880>
- ALMEIDA, Ana Beatriz Marques de et al. The proAKAP4 concentrations in Nelore bull sperm and their relation to FTAI conception rate results. *Animal Reproduction Science*, v. 247, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107156>
- AMANN, R. P.; KATZ, D. F. Reflections on CASA after 25 years. *Journal of Andrology*, v. 25, n. 3, p. 317-325, 2004.
<https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02804.x>
- AMARAL, A. et al. Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction*, v. 146, n. 5, p. R163-R174, 2013.
<https://doi.org/10.1530/REP-13-0178>
- ARCELAY, E. et al. Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *International Journal of Developmental Biology*, v. 52, n. 5-6, p. 463-472, 2008.
<https://doi.org/10.1387/ijdb.072555ea>
- ARRUDA, R. P. et al. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, n. 1, p. 8-16, 2007.
- ARRUDA, Rubens Paes de; CELEGHINI, Eneiva Carla Carvalho. Validação de técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. Porto Alegre: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2003. Acesso em: 26 nov. 2023.
- ASBIA. Index ASBIA 2022. Associação Brasileira de Inseminação Artificial; Cepea – Esalq/USP. Elaboração: Cepea – Esalq/USP. Disponível em: https://asbia.org.br/wp-content/uploads/Index/Index_ASBIA_2022.pdf. Acesso em: 17 ago. 2023.
- ASSUMPÇÃO, M. Elena O. D. A. et al. Capacitação espermática in vitro com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 39, p. 149-156, 2002.
<https://doi.org/10.1590/S1413-95962002000300008>
- AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v. 89, n. 1-4, p. 65-75, 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.06.025>
- BARROS, T.B. et al. O estudo proteômico e o seu potencial de avaliação da fertilidade em machos de diferentes espécies domésticas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 37, n. 3, p. 266-271, jul./set. 2013. Disponível em: <www.cbra.org.br>.
- BASTAN, I.; AKCAY, E. Quality assessment of frozen bull semen with the precursor A-kinase anchor protein 4 biomarker. *Andrologia*, v. 53, 2021.

<https://doi.org/10.1111/and.14164>

BERRY, D.P.; WAL, E. L.; PRYCE, J.E. Genetics and genomics of reproductive performance in dairy and beef cattle. *Animal*, v. 8, Supplement 1, p. 105-121, 2014.
<https://doi.org/10.1017/S1751731114000743>

BOCCIA, L. et al. Osteopontin improves sperm capacitation and in vitro fertilization efficiency in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v. 80, n. 3, p. 212-217, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.04.017>

BOERSMA, A. et al. Influence of sperm cryopreservation on sperm motility and proAKAP4 concentration in mice. *Reproductive Medicine and Biology*, v. 21, 2022.
<https://doi.org/10.1002/rmb2.12480>

BOUÉ, F.; BLAIS, J.; SULLIVAN, R. Surface localization of P34H, an epididymal protein, during maturation, capacitation, and acrosome reaction of human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v. 54, n. 5, p. 1009-1017, 1996.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod54.5.1009>

CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3. ed. 2013.

CEPEA/CNA. Produto Interno Bruto (PIB) do agronegócio brasileiro: 2024. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada – CEPEA/Esalq/USP; Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil – CNA, 2024. Disponível em:
<https://www.cepea.esalq.usp.br/pib-do-agronegocio-brasileiro>. Acesso em: 28 ago. 2024.

CLARA, MALO et al. Identification of proAKAP4 concentration variations in dromedary sperm and their correlation with monthly semen parameter. *Reproduction and Fertility*, v. 2, p. 268-279, 2021.
<https://doi.org/10.1530/RAF-21-0055>

CUNHA BUSTAMANTE-FILHO, I. et al. Bovine seminal plasma osteopontin: structural modeling, recombinant expression, and its relationship with semen quality. *Andrologia*, v. 53, n. 1, 2021.
<https://doi.org/10.1111/and.13905>

DELEHEDDE, M. et al. ProAKAP4 polypeptide as a biomarker of sperm functionality and male fertility disorders. *International Journal of Gynecology and Reproductive Sciences*, v. 2, n. 1, p. 13-19, 2019.

DELEHEDDE, M. et al. Assessment of the sperm specific protein proAKAP4 as a marker to evaluate sperm quality and fertility in Holstein bulls. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 43, n. 2, p. 472, 2019.
<https://doi.org/10.19080/JDVS.2019.11.555803>

DORDAS-PERPINYÀ, M. et al. ProAKAP4 Semen Concentrations as a Valuable Marker Protein of Post-Thawed Semen Quality and Bull Fertility: A Retrospective Study. *Veterinary Sciences*, v. 9, p. 224, 2022.

<https://doi.org/10.3390/vetsci9050224>

D'OCCHIO, M. J. et al. Adhesion molecules in gamete transport, fertilization, early embryonic development, and implantation—role in establishing a pregnancy in cattle: A review. *Molecular Reproduction and Development*, v. 87, n. 2, p. 206-222, 2020.

<https://doi.org/10.1002/mrd.23312>

DURAIRAJANAYAGAM, D. et al. Causes and consequences of sperm mitochondrial dysfunction. *Andrologia*, v. 53, n. 1, p. e13666, 2021.

<https://doi.org/10.1111/and.13666>

ESTEVEES, S. C. et al. Improvement in motion characteristics and acrosome status in cryopreserved human spermatozoa by swim-up processing before freezing. *Human Reproduction*, v. 15, n. 10, p. 2173-2179, 2000.

<https://doi.org/10.1093/humrep/15.10.2173>

FANG, X. et al. Proteomics and single-cell RNA analysis of Akap4-knockout mice model confirm indispensable role of Akap4 in spermatogenesis. *Developmental Biology*, v. 454, n. 2, p. 118-127, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.06.017>

FOUCHÉCOURT, S. et al. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. *Biology of Reproduction*, v. 62, n. 6, p. 1790-1803, 2000.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod62.6.1790>

FREITAS-DELL'AQUA, C. P. et al. Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v. 9, p. 941, 2012.

GADELLA, B. M. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Animal Reproduction Science*, 107(3-4), p. 229-236, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.05.009>

GARNER, D. L. et al. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biology of Reproduction*, v. 34, n. 1, p. 127-138, 1986.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod34.1.127>

GERENA, R. L. et al. Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biology of Reproduction*, v. 58, n. 3, p. 826-833, 1998.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod58.3.826>

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, v. 63, n. 2, p. 445-457, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.024>

GONÇALVES, R. F.; BARNABE, V. H.; KILLIAN, G. J. Pre-treatment of cattle sperm and/or oocyte with antibody to lipocalin type prostaglandin D synthase inhibits in vitro

fertilization and increases sperm–oocyte binding. *Animal Reproduction Science*, v. 106, n. 1-2, p. 188-193, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.12.019>

GRAHAM, J. K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R. H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biology of Reproduction*, v. 43, n. 1, p. 55-64, 1990.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod43.1.55>

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*, v. 11, n. 1, p. 73-88, 1990.

<https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1990.tb01583.x>

HERST, P. M. et al. Functional mitochondria in health and disease. *Frontiers in Endocrinology*, v. 8, p. 296, 2017.

<https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00296>

HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, E. O. et al. Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 9, p. 5623-5633, 2006.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M508172200>

HEZAVEHEI, M. et al. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive Biomedicine Online*, v. 37, n. 3, p. 327-339, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012>

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, v. 62, n. 1-3, p. 3-22, 2000.

[https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00152-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00152-4)

HOWES, E. A. et al. Cellular distribution and molecular heterogeneity of MAC393 antigen (clusterin, beta-chain) on the surface membrane of bull spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*, v. 4, n. 7, p. 673-681, 1998.

<https://doi.org/10.1093/molehr/4.7.673>

JANISZEWSKA, E. et al. The possible association of clusterin fucosylation changes with male fertility disorders. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 15674, 2021.

<https://doi.org/10.1038/s41598-021-95288-w>

JUMEAU, F. et al. A-kinase anchor protein 4 precursor (pro-AKAP4) in human spermatozoa. *Andrology*, v. 6, p. 854-859, 2018.

<https://doi.org/10.1111/andr.12524>

KOWALCZYK, A.; GAŁĘSKA, E.; BUBEL, A. The concentration of proAKAP4 and other indicators of cryopotential of spermatozoa cryopreserved in extender with Holothuroidea extract addition. *Animals*, v. 12, p. 521, 2022.

<https://doi.org/10.3390/ani12040521>

LAMONTAGNE, N. et al. Identification and characterization of P31m, a novel sperm protein in *Cynomolgus* monkey (*Macaca fascicularis*). *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, v. 59, n. 4, p. 431-441, 2001.
<https://doi.org/10.1002/mrd.1050>

LEITE, R. F. Análise lipídômica, metabolômica e dos atributos espermáticos de touros com diferentes taxas de fertilidade e perfis de congelamento de sêmen. 2022. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação: Reprodução Animal, Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2022. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10131/tde-30052022-092714/publico/Roberta_Ferreira_Leite_corrigida.pdf. Acesso em: 30 ago. 2023.

MARTIN, G. et al. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biology of Reproduction*, v. 71, n. 1, p. 28-37, 2004.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.024281>

MATOS, D. L. et al. Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literatura. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 32, n. 4, p. 225-232, 2008.

MONACO, E. et al. Effect of osteopontin (OPN) on in vitro embryo development in cattle. *Theriogenology*, v. 71, n. 3, p. 450-457, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.08.012>

MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, v. 51, n. 3, p. 241-249, 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2005.07.004>

MOURA, A. A. et al. Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 139-144, abr./jun. 2011. Disponível em: <www.cbra.org.br>.

NAGY, S. et al. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biology of Reproduction*, v. 68, n. 5, p. 1828-1835, 2003.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.011445>

NARUD, B. et al. Semen quality parameters including metabolites, sperm production traits and fertility in young Norwegian Red AI bulls. *Livestock Science*, v. 255, p. 104803, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104803>

NOGUEIRA, E. et al. Qualidade do sêmen e resultados em programas de IATF em bovinos. *Anais da IV Reunião Anual da Associação Brasileira de Andrologia Animal*, 07 e 08 de junho de 2019, p. 28-37.

PALMER, D. J.; CHRISTIE, D. L. Identification of molecular aggregates containing glycoproteins III, J, K (carboxypeptidase H), and H (Kex2-related proteases) in the soluble and membrane fractions of adrenal medullary chromaffin granules. *Journal of Biological Chemistry*, v. 267, n. 28, p. 19806-19812, 1992.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)88625-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)88625-8)

PARKS, J. E.; LYNCH, D. V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, v. 29, n. 2, p. 255-266, 1992.
[https://doi.org/10.1016/0011-2240\(92\)90024-V](https://doi.org/10.1016/0011-2240(92)90024-V)

PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron*, v. 37, n. 7, p. 597-612, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.micron.2006.02.006>

SEVERO, N. C. História Ilustrada da Inseminação Artificial. 1. ed. São Paulo / Rio de Janeiro: Livre Expressão, 2013. p. 279.

SIEME, H.; HARRISON, R. A. P.; PETRUNKINA, A. M. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. *Animal Reproduction Science*, v. 107, n. 3-4, p. 276-292, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.05.001>

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

SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, v. 65, n. 5, p. 958-978, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.010>

SILVA, S.V. et al. Diferentes Métodos e técnicas na avaliação espermática: uma breve revisão. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, Recife, v. 12, p. 1-15, 2009.

SINGH, B.K. Compêndio de andrologia e inseminação artificial em animais de fazenda. São Paulo: Andrei Editora, 2006. 331p.

ST. JOHN, J. C. et al. Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: a journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells. *Human Reproduction Update*, v. 16, n. 5, p. 488-509, 2010.
<https://doi.org/10.1093/humupd/dmq002>

SOUZA, F. A. Avanços na inseminação artificial e o impacto na produtividade bovina. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 45, n. 2, p. 89-95, 2023.

SULLIVAN, R. Male fertility markers, myth or reality. *Animal Reproduction Science*, v. 82, p. 341-347, 2004.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.05.007>

TAPIA, J. A. et al. The membrane of the mammalian spermatozoa: much more than an inert envelope. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 47, p. 65-75, 2012.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02046.x>

TROUGAKOS, I. P. The molecular chaperone apolipoprotein J/clusterin as a sensor of oxidative stress: implications in therapeutic approaches—a mini-review. *Gerontology*, v. 59, n. 6, p. 514-523, 2013.

<https://doi.org/10.1159/000351207>

TURNER, R.M.O. et al. An X-linked gene encodes a major human sperm fibrous sheath protein, hAKAP82. Genomic organization, protein kinase A-RII binding, and distribution of the precursor in the sperm tail. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 48, p. 32135-32141, 1998.

<https://doi.org/10.1074/jbc.273.48.32135>

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v. 57, n. 1, p. 149-179, 2002.

[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00664-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00664-1)

VISCONTI, P. E. et al. Capacitation of mouse spermatozoa: II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development*, v. 121, n. 4, p. 1139-1150, 1995.

<https://doi.org/10.1242/dev.121.4.1139>

VISCONTI, P.E. et al. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian Journal of Andrology*, v. 13, n. 3, p. 395, 2011.

<https://doi.org/10.1038/aja.2010.69>

WOODS, E.J. et al. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*, v. 48, p. 146-156, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.03.002>

ZHANG, G. et al. Mitochondrial functionality modifies human sperm acrosin activity, acrosome reaction capability, and chromatin integrity. *Human Reproduction*, v. 34, n. 1, p. 3-11, 2019.

<https://doi.org/10.1093/humrep/dey335>

ZOROVA, L. D. et al. Mitochondrial membrane potential. *Analytical Biochemistry*, v. 552, p. 50-59, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009>