



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

RACHEL FERREIRA BRAGA

Uso de trans-anetol purificado na
criopreservação de sêmen ovino

Dissertação de Mestrado submetida a
Universidade Federal Fluminense visando à obtenção do grau de
Mestre em Ciências e Biotecnologia

Orientadoras: Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan
Bruna Rios Coelho Alves



Niterói
2023

RACHEL FERREIRA BRAGA

**Uso de trans-anetol purificado na criopreservação
de sêmen ovino**

Trabalho desenvolvido nos Laboratórios de Reprodução Animal do Departamento de Patologia e Clínica Veterinária e na Unidade de Pesquisa Experimental em Caprinos e Ovinos (UniPECO) da Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia, Universidade Federal Fluminense. Apoio Financeiro: CAPES, CNPq e FAPERJ

Dissertação de Mestrado
submetida a Universidade
Federal Fluminense como
requisito parcial visando à
obtenção do grau de Mestre
em Ciências e Biotecnologia

**Orientadoras: Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan
Bruna Rios Coelho Alves**

RACHEL FERREIRA BRAGA

Uso de trans-anetol purificado na criopreservação de sêmen ovino

Dissertação de Mestrado
submetida a Universidade
Federal Fluminense como
requisito parcial visando à
obtenção do grau de Mestre
em Ciências e Biotecnologia

Banca Examinadora:

Joanna Maria
Gonçalves de Souza
Fabjan

Assinado de forma digital por
Joanna Maria Gonçalves de Souza
Fabjan
Dados: 2023.04.11 15:00:30 -03'00'

**Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan – Departamento de Patologia e
Clínica Veterinária – Universidade Federal Fluminense
(Orientadora/Presidente)**

Documento assinado digitalmente

 RIBRIO IVAN TAVARES PEREIRA BATISTA
Data: 11/04/2023 13:44:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista – Departamento de Patologia e Clínica
Veterinária – Universidade Federal Fluminense**

Documento assinado digitalmente

 MARCILIO NICHÍ
Data: 11/04/2023 13:01:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Marcilio Nichi – Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo**

Documento assinado digitalmente

 JOSE DE OLIVEIRA CARVALHO NETO
Data: 11/04/2023 20:16:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**José de Oliveira Carvalho Neto – Departamento de Medicina Veterinária -
Universidade Federal do Espírito Santo**

Lucas Francisco Leodido Correia
lucascorreia@id.uff.br:15154286723

Assinado de forma digital por Lucas Francisco
Leodido Correia lucascorreia@id.uff.br:15154286723
Dados: 2023.04.11 14:53:27 -03'00'

**Lucas Francisco Leodido Correia – Departamento de Patologia e Clínica
Veterinária – Universidade Federal Fluminense**

Dedico esta dissertação primeiramente a Deus, por ter permitido que eu chegasse aqui; também dedico à minha mãe, por todo o seu apoio durante todos esses anos; por fim, dedico ao meu pai, que apesar de não estar mais entre nós, também sempre me apoiou e tenho certeza de que ficaria muito alegre em saber de mais esta conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois Ele tem sido meu auxílio e tem me dado forças e oportunidades que eu nunca imaginaria ter.

À minha mãe Marlene, por sempre estar ao meu lado em todos estes anos, sempre se esforçando para não deixar nada faltar, assim como sempre garantindo que eu ficasse bem. Agradeço também ao meu pai Marcus, que sempre me apoiou nas minhas escolhas e sempre me apoiou como pôde. Você faz falta, pai.

Agradeço imensamente às pessoas que me deram apoio nesses últimos meses e que sabem o quanto a situação ficou complicada nesse final de 2022 e início de 2023:

À Beatriz Santana, Estéfani Borba, e Ludmila Gomes que têm sido presentes de Deus na minha vida e têm se feito presentes mesmo nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora Joanna, por continuar acreditando em mim e me proporcionar tantas oportunidades, mesmo quando tenho dúvidas de que sou capaz. Obrigada por todos os incentivos que tem me dado. Também agradeço à minha coorientadora Bruna, que tem me ajudado a melhorar cada dia mais minha visão crítica.

Agradeço também ao Lucas Correia e à Viviane Brair, por continuarem a ser pessoas especiais na minha vida e também pela eterna paciência em me aturar nos momentos de dúvidas.

À Mariana Guimarães e Gabriela Leal, vocês são pessoas maravilhosas e fiquei feliz por seu apoio no início deste ano. Todas as pessoas que citei até aqui, muito obrigada de coração. Mesmo que nem sempre eu saiba expressar muito bem minha gratidão, sou verdadeiramente grata a todos vocês.

Agradeço ao Grupo de Estudos em Reprodução dos Animais Domésticos (GERAD) por permitir meu crescimento ao longo desse período, possibilitando a troca de experiências e de conhecimentos.

Agradeço ao professor Felipe Zandonadi Brandão não apenas por possibilitar o uso da UniPECO, mas também pela paciência com todas minhas dúvidas e pedidos durante o período deste estudo.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade da bolsa recebida nestes dois últimos anos e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento. Também agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Biotecnologia, por me permitir aprender tanto nesta caminhada.

Por fim, deixo meu agradecimento à todas as pessoas que passaram pela minha vida e que me ajudaram de alguma forma, seja em alguma necessidade ou mesmo na minha formação como pessoa. Muito obrigada.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.....	IX
Lista de ilustrações.....	XII
Resumo.....	XIV
Abstract.....	XV
1 Introdução.....	1
1.1 Tecnologias de reprodução assistida em ovinos.....	2
1.2 Tecnologia do sêmen.....	3
1.2.1 Coleta.....	3
1.2.2 Avaliação seminal.....	4
1.2.3 Avaliação espermática.....	6
1.2.3.1 Avaliações de cinética de movimento.....	6
1.2.3.2 Análises morfológicas e funcionais.....	7
1.2.4 Criopreservação.....	11
1.2.5 Efeitos da criopreservação no sêmen.....	14
1.3 Espécies reativas de oxigênio na célula espermática.....	17
1.4 O trans- <i>anetol</i>	18
2 Objetivo geral.....	21
2.1 Objetivos específicos.....	21
2.1.1 Parâmetros cinéticos de motilidade.....	21
2.1.2 Características morfológicas dos espermatozoides.....	21
2.1.3 Integridade de membrana plasmática e acrossomal.....	21
2.1.4 Atividade mitocondrial dos espermatozoides.....	21
2.1.5 Capacidade de ligação à membrana perivitelínica.....	21
2.1.6 Estresse oxidativo, através da lipoperoxidação.....	21
3 Material e métodos.....	22
3.1 Aprovação ética, local e animais.....	22
3.2 Reagentes.....	22
3.3 Desenho Experimental.....	22
3.4 Congelamento e Descongelo.....	23
3.5 Análises Microscópicas.....	23
3.5.1 Cinética Espermática.....	24

3.5.2 Teste hiposmótico.....	24
3.5.3 Integridade de membrana.....	25
3.5.4 Atividade mitocondrial.....	25
3.5.5 Status acrossomal.....	25
3.5.6 Teste de Ligação à Membrana Perivitelínica.....	26
3.5.7 Morfologia espermática.....	27
3.5.8 Lipoperoxidação.....	27
3.6 Análises Estatísticas.....	27
4 Resultados.....	29
4.1 Parâmetros pré-congelamento.....	29
4.2 Parâmetros pós descongelamento.....	30
4.2.1 Cinética espermática.....	30
4.2.2 Avaliações morfológicas e funcionais.....	32
5 Discussão.....	36
6 Considerações finais.....	40
6.1 Perspectivas.....	40
7 Referências bibliográficas.....	40
8 Apêndices e anexos.....	54
8.1 Anexo I – Folha de aprovação do Comitê de Ética.....	54
8.2 Resumo apresentado da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE) 2022.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°	Graus
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
µM	Micromolar
®	Marca registrada
ATP	Adenosina trifosfato
ARTs	<i>Assisted reproductive technologies</i> (Tecnologias de reprodução assistida)
ALH	Amplitude do deslocamento lateral da cabeça
AN	Trans-anetol
BCF	Frequência do batimento cruzado
Ca ²⁺	Cálcio
CASA	<i>Computer-assisted sperm analysis</i>
CATSPER	<i>Cation channel of sperm</i> (Canal de cátion de espermatozoide)
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
CTC	Clortetraciclina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FERT-TALP	<i>Fertilization Tyrode-Albumina-Lactato-Piruvato</i>
g	Grama
GLMM	<i>Generalized Linear Mixed Model</i> (Modelo linear generalizado misto)
h	Hora
Hz	Hertz
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ O	Água

IA	Inseminação artificial
Kg	Quilograma
L	Litro
LIN	Linearidade
MDA	Malonaldeído
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mOsm	Miliosmois
N	Normal
nm	Nanômetro
O	Oeste
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH ⁻	Radical hidroxila
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
SEM	<i>Standard error of the mean</i> (Erro padrão da média)
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Espécies reativas de oxigênio)
S	Sul
s	Segundos
SCA	<i>Sperm class analyzer</i>
sptzs	Espermatozoides
STR	Retilinearidade
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i> (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)
TCA	Tris ácido cítrico
VAP	Velocidade média do percurso
VCL	Velocidade curvilínea
VSL	Velocidade linear

v/v	Volume/volume
UI	Unidades internacionais
UniPECO	Unidade de pesquisa experimental em caprinos e ovinos
WOB	Coeficiente de oscilação
ZP	Zona pelúcida
ZP1	Glicoproteína da Zona Pelúcida 1
ZP3	Glicoproteína da Zona Pelúcida 3

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Lista de Figuras	Página
Figura 1 Gráfico de colunas representando (A) o número de espermatozoides (sptzs) com membrana íntegra e (B) o número de sptzs reativos ao teste hiposmótico (íntegros) em sêmen ovino descongelado. Meios tratados ou não com trans-anetol: não tratado – CONT; tratado com 10 µM - AN10; 50 µM – AN50; ou 100 µM – AN100. Dados apresentados como média ± SEM. Letras diferentes diferem significativamente para cada parâmetro (P < 0,05).....	32
Figura 2 Gráfico de colunas representando, em sêmen ovino descongelado (A) a porcentagem de espermatozoides com atividade mitocondrial detectada, pela coloração com sonda MitoTracker, (B): a quantificação do teste de lipoperoxidação (resultados expressos em ng de Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) por mL). Meios tratados ou não com trans-anetol: não tratado – CONT; tratado com 10 µM - AN10; 50 µM – AN50; ou 100 µM – AN100. Dados apresentados como média ± SEM. Letras diferentes diferem significativamente para cada parâmetro (P < 0,05).....	33
Figura 3 Gráfico de colunas representando a porcentagem de espermatozoides (sptzs) capacitados, não capacitados e reagidos. Meios tratados ou não com trans-anetol: não tratado – CONT; tratado com 10 µM - AN10; 50 µM – AN50; ou 100 µM – AN100. Dados apresentados como média ± SEM. Não houve diferença nos parâmetros para todos os tratamentos (P > 0,05).....	34
Figura 4 (A) Gráfico de colunas representando o número de espermatozoides (sptzs) ligados à membrana perivitelínica	35

por mm². **(B)** Imagens representativas do teste de ligação à membrana perivitelínica. Sptzs corados por Hoechst, aumento de x 200. Setas vermelhas indicam a membrana. Meios tratados ou não com trans-anetol: não tratado – CONT; tratado com 10 µM - AN10; 50 µM – AN50; ou 100 µM – AN100. Dados apresentados como média ± SEM. Letras diferentes diferem significativamente para cada parâmetro (P < 0,05).....

Lista de Tabelas	Página
Tabela 1 Definições dos parâmetros cinéticos avaliados com o <i>Computer Assisted Semen Analysis</i> – CASA (Adaptado de OLIVARES, 2017).....	8
Tabela 2 Estudos que utilizaram diferentes fontes contendo trans-anetol na sua composição na criopreservação ou não de sêmen.....	20
Tabela 3 Parâmetros (média ± SEM) analisados em sêmen ovino após diluição (pré-congelamento) com meios contendo ou não trans-anetol (AN) purificado.....	29
Tabela 4 Parâmetros (média ± SEM) de cinética espermática imediatamente após descongelamento de sêmen ovino criopreservado com meio contendo ou não trans-anetol (AN) purificado.....	31
Tabela 5 Parâmetros (média ± SEM) de morfologia espermática avaliados após descongelamento em sêmen ovino criopreservado com meio contendo ou não trans-anetol (AN) purificado.....	33

RESUMO

A criopreservação de sêmen associada à inseminação artificial torna mais eficiente a propagação de características zootécnicas de interesse. No entanto, esse processo leva ao estresse oxidativo dos espermatozoides, reduzindo sua viabilidade. O trans-anetol, um antioxidante natural encontrado em plantas, parece melhorar a sobrevivência dessas células durante a criopreservação de sêmen. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de diferentes concentrações de trans-anetol purificado no meio de criopreservação de sêmen ovino. Para isso, seis carneiros foram submetidos a coleta seminal via vagina artificial por sete dias. Ejaculados com motilidade espermática $\geq 80\%$ ($n=30$) foram diluídos individualmente com meio Tris-Gema, e divididos nos seguintes tratamentos, de acordo com a concentração de trans-anetol adicionado ao meio: CONT ($0 \mu\text{M}$), AN10 ($10 \mu\text{M}$), AN50 ($50 \mu\text{M}$) e AN100 ($100 \mu\text{M}$). O sêmen foi congelado em máquina própria e descongelado a 37°C por 30 s. Análises foram realizadas no momento da diluição (cinética espermática, integridade de membrana plasmática, hiposmótico e atividade mitocondrial) e imediatamente após o descongelamento (cinética espermática, integridade de membrana plasmática, hiposmótico, atividade mitocondrial, status acrossomal, ligação à membrana perivitelínica e lipoperoxidação). Os dados foram analisados usando um modelo misto linear generalizado. Após o descongelamento, o grupo AN100 apresentou melhores resultados ($P < 0,05$) nos parâmetros de motilidade progressiva e espermatozoides com velocidade média, quando comparado aos outros grupos. Além disso, AN100 também apresentou mais espermatozoides com velocidade rápida que o CONT e AN10 ($P < 0,05$). No teste de ligação à membrana perivitelínica, AN100 e AN50 tenderam a ter ($P = 0,08$) mais espermatozoides ligados à membrana. Por outro lado, no teste hiposmótico, AN100 apresentou menos espermatozoides com membrana ativa quando comparado aos grupos CONT e AN10 ($P < 0,05$) e maiores níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) do que AN10 e AN50 ($P < 0,05$). O AN10 foi o grupo que apresentou menores níveis de TBARS quando comparado aos grupos CONT e AN100 ($P < 0,05$). Assim, é possível afirmar que concentrações de 10 e $50 \mu\text{M}$ de trans-anetol no diluidor possuem efeitos positivos nos espermatozoides ovinos, aumentando sua motilidade progressiva, habilidade de ligação à membrana, além de possuir efeito antioxidante na criopreservação de sêmen, mas sua alta concentração parece afetar a membrana dessas células.

Palavras-chave: antioxidante, erva-doce, congelamento, malonaldeído, ROS

ABSTRACT

Semen cryopreservation associated with artificial insemination increases the efficiency for propagation of zootechnical characteristics of interest. However, this process leads to oxidative stress of sperm, reducing their viability. Trans-anethole, a natural antioxidant found in plants, appears to improve the survival of these cells during semen cryopreservation. The aim of this study was to evaluate the effects of different concentrations of commercial trans-anethole in ram semen cryopreservation extender. Six rams were submitted to a seminal collection with artificial vagina for seven days. Ejaculates with sperm motility $\geq 80\%$ ($n=30$) were individually diluted with Tris-Egg-Yolk extender, and allocated into the following treatments, according to the concentration of commercial trans-anethole added to the extender: CONT (0 μM), AN10 (10 μM), AN50 (50 μM) and AN100 (100 μM). The semen was frozen in a machine and thawed at 37 °C for 30 s. Analyses were performed at the time of dilution (sperm kinetics, plasma membrane integrity, hypoosmotic, and mitochondrial activity) and immediately after thawing (sperm kinetics, plasma membrane integrity, hypoosmotic, mitochondrial activity, acrosomal status, binding to the perivitelline membrane, and lipid peroxidation). Data were analyzed using a generalized linear mixed model. After thawing, the AN100 group presented better results ($P < 0.05$) of progressive motility and spermatozoa with average velocity when compared to the other groups. In addition, AN100 also had more fast sperm when compared to CONT and AN10 ($P < 0.05$). In the perivitelline membrane binding test, AN100 and AN50 tended to have more sperm bound to the membrane ($P = 0.08$). However, in the hypoosmotic test, AN100 showed fewer sperm with active membranes when compared to the CONT and AN10 groups ($P < 0.05$). Moreover, AN100 also had higher levels of TBARS when compared to AN10 and AN50 groups ($P < 0.05$). AN10 had the lowest TBARS levels when compared to CONT and AN100 ($P < 0.05$). Therefore, adding concentrations of 10 and 50 μM of trans-anethole in the extender has positive effects on ovine spermatozoa, increasing progressive motility, ability to bind to the membrane, and an antioxidant effect in semen cryopreservation, but it seems that a higher concentration can affect these cell membranes.

Keywords: antioxidant, fennel, freezing, malondialdehyde, ROS

1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura possui grande importância no mundo em vários aspectos. A criação de ovinos é principalmente relevante em áreas em que o ambiente não é favorável à criação de gado bovino, sendo então uma atividade econômica importante em regiões mais áridas. Além disso, devido a características similares aos humanos, como peso, estrutura óssea e articular, assim como na sua composição genética e fisiológica, a espécie ovina também é utilizada como modelo em estudos de doenças ortopédicas e hereditárias (MORRIS, 2009; FIGUEIROA *et al.*, 2011; PINNAPUREDDY *et al.*, 2015). Em 2022, a produção de carne da espécie ovina chegou a 16,6 milhões de toneladas, o que corresponde a 4,6% da produção de carne no mundo (FAO, 2022). Além da carne, o leite e outros produtos como a lã também podem ser obtidos desses animais (MORRIS, 2009). No Brasil, a ovinocultura possui importância econômico-social e, em 2020, o rebanho ovino do país constava de 20.628.699 cabeças distribuídas por todo o território (FAOSTAT, 2022). Ainda assim, a produção não é suficiente para atender a demanda interna e produtos de origem ovina são importados (EMBRAPA, 2018).

Para auxiliar no incremento da produção animal, ferramentas como a criopreservação de gametas são utilizadas com a finalidade de aumentar a eficiência do melhoramento genético (UGUR *et al.*, 2019). A criopreservação de sêmen, quando associada à inseminação artificial (IA), permite maior flexibilidade na aplicação desta última, além de possibilitar a troca genética entre indivíduos de lugares distantes, sem a necessidade do transporte dos mesmos (LV *et al.*, 2019). Apesar dessas vantagens, o congelamento de sêmen ovino ainda não tem sido tão utilizado na produção ovina em larga escala, devido a algumas limitações, como a redução significativa na viabilidade dos espermatozoides após o processo de criopreservação (PERIS-FRAU *et al.*, 2020).

Devido à necessidade de aprimoramento das técnicas de criopreservação, diferentes estratégias têm sido testadas para reduzir os danos causados durante o processo. Com isso, estudos têm utilizado diferentes substâncias com a finalidade de aumentar a proteção das células durante a congelação (PERIS-

FRAU *et al.*, 2020). Dentre estes, estão compostos obtidos a partir de plantas, devido às propriedades benéficas observadas em outros tipos celulares, já documentadas na literatura (ROS-SANTAELLA E PINTUS, 2021). Com isso, tanto o extrato obtido de plantas, quanto o principal composto de interesse na sua forma purificada, têm sido objeto de pesquisa na criopreservação de sêmen de animais de produção (ROS-SANTAELLA E PINTUS, 2021; SHARAFI *et al.*, 2022).

1.1 TECNOLOGIAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA EM OVINOS

O desenvolvimento das Tecnologias de Reprodução Assistida (do inglês, ARTs), representou um marco para a humanidade, permitindo, em humanos, que casais com problemas de fertilidade tenham filhos (OMBELET E VAN ROBAYS, 2015). A primeira IA realizada com sucesso foi em 1784, em uma cadela, por Lazzaro Spallanzani, resultando no nascimento de três filhotes. Já em ovinos, esta técnica começou a ser utilizada por volta do início dos anos 1900 (FOOTE, 2002). Além disso, sua utilização em animais domésticos também tem sido importante principalmente na produção animal, permitindo a aceleração do melhoramento genético, ampliando a oportunidade de procriação de indivíduos geneticamente superiores (LAYEK *et al.*, 2016). Dentre as ARTs aplicadas, é possível realizar a coleta e criopreservação de sêmen para ser utilizado na IA ou na Produção *in vitro* de Embriões (PIVE). Em ambos os casos, o uso de sêmen criopreservado tem a vantagem de permitir o planejamento do momento e local em que será realizado seu uso, além de permitir a possibilidade de nascimento de descendentes mesmo após o falecimento do macho (ANDRABI E MAXWELL, 2007).

No entanto, em ovinos, algumas características levam a resultados menos satisfatórios quando o sêmen criopreservado é utilizado na IA. Após o descongelamento, 40 a 60% dos espermatozoides se mantêm móveis, mas apenas 20 a 30% das células são biologicamente viáveis (LV *et al.*, 2019). Esse fator, associado à dificuldade em se realizar a IA transcervical devido à anatomia da cérvix ovina, contribui para uma relativa baixa taxa de prenhez, que pode variar de 30 a 70% (GIBBONS *et al.*, 2019). Apesar da possibilidade da IA ser

realizada pelo uso de laparoscopia, esta ainda é uma realidade pouco corriqueira nessa espécie, devido à necessidade de equipamentos e profissionais mais especializados (BAILEY *et al.*, 2000; LV *et al.*, 2019). Além disso, há questões relacionadas ao bem-estar animal, já que esta técnica é mais invasiva do que a IA transcervical, assim como a necessidade de jejum do animal por tempo prolongado (FONSECA *et al.*, 2016). Assim, espera-se que melhorar a qualidade do sêmen criopreservado propicie o aumento da população de espermatozoides viáveis dentro do trato reprodutivo da fêmea, permitindo resultados mais satisfatórios com a IA (SALAMON E MAXWELL, 2000).

1.2 TECNOLOGIA DO SÊMEN

1.2.1 Coleta

O interesse humano pela reprodução é documentado desde o século XVII, quando foram feitas as primeiras observações de espermatozoides ao microscópio por Leeuwenhoek, em 1677 (COBB, 2012). A partir de então, estudiosos da época aprofundaram-se no assunto e, em 1784, Lazzaro Spallanzani realizou a primeira IA em uma cadela, o que resultou no nascimento de três filhotes. Muitos anos depois, em 1938, foi desenvolvido por Milanov, na Rússia, um dos métodos de coleta seminal até hoje utilizado, denominado de vagina artificial (OMBELET E VAN ROBAYS, 2015; LONERGAN, 2018). Como o nome sugere, esse método simula o aparelho reprodutivo da fêmea e é a forma de coleta mais próxima ao natural, e pode ser utilizada em diferentes espécies, sendo confeccionada de acordo com as proporções e características anatômicas e fisiológicas próprias de cada animal (GREYLING E GROBBELAAR, 1983; VILLAVERDE *et al.*, 2013). Mesmo com suas vantagens, há a necessidade de algum treinamento dos machos para utilização deste método e há casos em que há necessidade da presença de uma fêmea em estro para servir de estímulo (WULSTER-RADCLIFFE *et al.*, 2001).

Outro método utilizado para coleta de sêmen consiste na utilização de um estimulador elétrico denominado eletroejaculador, o qual, por meio de

descargas elétricas programadas, gera estimulação das glândulas acessórias, levando à ejaculação (ABRIL-SÁNCHEZ *et al.*, 2019). Outras formas de coleta utilizadas para obtenção de ejaculados incluem a manipulação digital e a cateterização uretral. Ambas as técnicas possuem como vantagem a obtenção de uma amostra mais próxima à fisiológica, assim como a da vagina artificial, mas a primeira se aplica a poucas espécies (como os cães), enquanto a segunda necessita da sedação do animal (ZAMBELLI *et al.*, 2008). É possível também se obter espermatozoides diretamente do trato reprodutivo masculino, geralmente da cauda do epidídimo e/ou ducto deferente, sendo esta via de obtenção importante principalmente em pesquisas (utilização de materiais provenientes de castração de pequenos animais, ou de estudo em pequenos roedores de laboratório) e em caso de morte do animal (HASSAN *et al.*, 2021).

Em ovinos, as técnicas mais utilizadas são a vagina artificial e eletroejaculação. No entanto, neste último caso há a preocupação em relação ao bem-estar animal, já que já foi demonstrado que os indivíduos coletados por esse método apresentam respostas típicas relacionadas ao estresse (ABRIL-SÁNCHEZ *et al.*, 2019). Para reduzir este estresse, é possível realizar anestesia geral e sedação, o que torna a aplicação da técnica mais complexa (ABRIL-SÁNCHEZ *et al.*, 2018). Além disso, como há estimulação maior das glândulas sexuais acessórias, o ejaculado obtido por eletroejaculação possui maior volume, devido à maior proporção de plasma seminal (LEDESMA *et al.*, 2014; ABRIL-SÁNCHEZ *et al.*, 2019). Assim, a utilização da vagina artificial é um método preferencial para a coleta seminal na espécie ovina, com menor estresse ao animal e obtenção de sêmen mais próximo das suas características fisiológicas.

1.2.2 Avaliação Seminal

Os parâmetros de qualidade seminal são influenciados não apenas pela espécie, mas também por fatores individuais e aqueles relacionados a cada ejaculado produzido em um mesmo animal. Desta forma, é importante que sejam realizadas avaliações do sêmen e espermáticas para selecionar amostras

que possuam as características consideradas ideais para a espécie e que podem ser utilizadas tanto para uso imediato, quanto para a criopreservação.

O sêmen possui diferentes componentes como plasma seminal e espermatozoides maduros e imaturos, além de células não reprodutivas, microrganismos e debris não específicos (PARAMIO E ISQUIERDO, 2014). O plasma seminal é um meio complexo, secretado primariamente pelas glândulas sexuais acessórias, que em ovinos consistem na próstata, glândulas vesiculares e glândulas bulbouretrais (NOAKES *et al.*, 2001). A função do plasma é fornecer ao sêmen componentes (incluindo açúcares como a frutose), que irão auxiliar na manutenção dos espermatozoides, bem como no transporte das células espermáticas no trato genital da fêmea (RICKARD *et al.*, 2016). No caso do carneiro, o volume do ejaculado varia conforme o método de coleta, sendo 0,5 a 3 mL quando coletado por vagina artificial, ou maior quando a coleta é realizada por eletroejaculação, em face do aumento do volume do plasma seminal, que é inerente a este último método (JIMÉNEZ-RABADÁN *et al.*, 2012; CBRA, 2013).

Alguns parâmetros são importantes para se determinar a qualidade do sêmen coletado e devem ser observados assim que possível após a obtenção do ejaculado. Logo após a coleta, o ejaculado é avaliado tanto macro como microscopicamente, por meio de análises que compõem o spermograma. Uma das avaliações macroscópicas diz respeito ao aspecto do sêmen, que pode apresentar coloração desde esbranquiçada a amarelada, e aparência cremosa a aquosa (CBRA, 2013). A observação da coloração fora dos padrões esperados de normalidade, é um indicativo de possível contaminação, por exemplo, com sangue (vivo ou hemolisado) ou componentes inflamatórios. A avaliação microscópica do sêmen permite a detecção de leucócitos e outros tipos celulares no mesmo, contribuindo para a determinação da possibilidade de utilização da amostra para fertilização ou congelamento (HENKEL E SCHILL, 2003). Já a aparência, que é uma classificação que possui relação com a viscosidade do sêmen, reflete a concentração de espermatozoides presentes no mesmo, sendo amostras cremosas com concentração alta, enquanto as aquosas apresentam baixas concentrações espermáticas (oligozoospermicas) (CBRA, 2013).

Em animais domésticos os parâmetros considerados normais variam de espécie para espécie, principalmente em relação à volume e concentração. Em espécies de alta concentração espermática, como os ruminantes, o turbilhonamento (ou movimento de massa) é avaliado microscopicamente em uma gota de sêmen em lâmina. A classificação mínima desejável é três, em uma escala de zero a cinco, em que zero é a ausência de turbilhonamento e cinco um valor acentuado de movimento de massa (CBRA, 2013). A avaliação da concentração espermática pode ser feita por meio de diferentes métodos: contagem de alíquota de espermatozoides em câmara de Neubauer, espectrofotometria, citometria de fluxo, ou por meio de análise de imagens em aparelhos de microscopia associados a *softwares* específicos (BRITO *et al.*, 2016). Em ovinos, a concentração média de espermatozoides em um ejaculado é de 2,5 a 6 × 10⁹/mL quando a coleta é realizada por vagina artificial, sendo geralmente menor quando o sêmen é coletado por eletroejaculação (LARSEN, 2021).

1.2.3 Avaliação espermática

1.2.3.1. Avaliações de cinética de movimento

Uma das primeiras análises espermáticas a ser realizada é a observação da movimentação dos espermatozoides, a partir da qual podem ser obtidas as informações de motilidade e vigor. O vigor é um dado subjetivo, já que é determinado a partir da observação do avaliador e, portanto, depende do seu treinamento. Este parâmetro representa a intensidade do movimento do espermatozoide, com classificação de um a cinco, sendo um o movimento exclusivamente oscilatório, enquanto cinco é progressivo retilíneo e muito rápido. (CBRA, 2013). Já a análise da motilidade é feita pela quantificação da porcentagem de espermatozoides vistos em movimento. Esta pode ser obtida a partir da observação em microscopia óptica, e estimada pelo avaliador, o que leva a variações técnico-dependente e maior subjetividade. Em um carneiro saudável e sexualmente maduro, espera-se que os espermatozoides

apresentem pelo menos 80% de motilidade e que o vigor dos seus movimentos esteja com classificação mínima de três (CBRA, 2013).

A avaliação da motilidade também pode ser feita a partir de uma análise computadorizada (*Computer Assisted Semen Analysis – CASA*), que a torna mais objetiva e fornece uma quantidade maior de dados relacionados à cinética espermática. Já foi demonstrado que estes dados podem ser correlacionados com a fertilidade, mesmo que ainda não haja consenso sobre a validade desta correlação (BROEKHUIJSE *et al.*, 2011; TSAKMAKIDIS, 2010; DEL OLMO *et al.*, 2013). A partir da análise do CASA, a motilidade é classificada em motilidade total, progressiva e não progressiva. Além disso, esta análise fornece os seguintes parâmetros: velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidade linear (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade média do percurso (VAP, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), frequência do batimento cruzado (BCF, Hz), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %) e coeficiente de oscilação (WOB, %) (MORTIMER E SWAN, 1995; VERSTEGEN *et al.*, 2002) (Tabela 1). Todos esses parâmetros fornecem as diferentes características dos movimentos das células espermáticas e, recentemente, também têm sido utilizados para classificar as diferentes subpopulações espermáticas existentes no sêmen (HIDALGO *et al.*, 2021).

1.2.3.2 Análises morfológicas e funcionais

As análises morfológicas e funcionais possuem a função de acessar a integridade bioquímica, genética e física dos espermatozoides. Diferentes testes foram desenvolvidos buscando-se associar a precisão e praticidade, visando bom custo-benefício. Algumas avaliações que são realizadas incluem: integridade de membranas plasmática (ALFRADIQUE *et al.*, 2018) e acrossomal (CORMIER *et al.*, 1997), morfologia espermática (CHENOWETH *et al.*, 2005), atividade mitocondrial (DRUART *et al.*, 2009), lipoperoxidação (SARLÓS *et al.*, 2002) e teste de ligação à membrana perivitelínica (CAMPOS *et al.*, 2017). A importância de todas essas análises se dá não apenas por selecionar a amostra de sêmen de maior qualidade do ponto de vista reprodutivo, mas também para

se acessar a magnitude de alterações que ocorrem durante o processo de criopreservação.

Tabela 1. Definições dos parâmetros cinéticos avaliados com o *Computer Assisted Semen Analysis* – CASA (Adaptado de OLIVARES, 2017).

Parâmetro	Nome	Definição
VCL ($\mu\text{m/s}$)	Velocidade curvilínea	Velocidade média do espermatozoide de um ponto a outro do trajeto realizado, incluindo todos os desvios do movimento de sua cabeça
VSL ($\mu\text{m/s}$)	Velocidade linear	Velocidade média percorrida em linha reta entre os pontos inicial e final do percurso
VAP ($\mu\text{m/s}$)	Velocidade média do percurso	Velocidade média ininterrupta do trajeto da célula
ALH (μm)	Amplitude do deslocamento lateral da cabeça	Amplitude do deslocamento médio da cabeça do espermatozoide em sua trajetória real
BCF (Hz)	Frequência do batimento cruzado	Frequência que a cabeça do espermatozoide cruza sua trajetória média por segundo
LIN (%)	Linearidade	Valor médio da proporção entre VSL e VCL
STR (%)	Retilinearidade	Valor médio da proporção entre VSL e VAP. Estima a proximidade do percurso da célula a uma linha reta
WOB (%)	Coeficiente de oscilação	Valor médio da proporção entre VAP e VCL

A morfologia espermática pode ser avaliada utilizando diferentes técnicas, como a câmara úmida (analisada sob microscopia de contraste de fase) e esfregaço corado (sendo eosina-nigrosina um dos corantes possíveis de ser

utilizado, analisado sob microscopia óptica de campo claro). O primeiro método é o mais recomendado, já que a realização do esfregaço para coloração resulta em maior ocorrência de cabeças destacadas por conta da técnica (CBRA, 2013). Em ambos os casos, após a confecção das lâminas, as células são observadas e classificadas como normais e anormais e, as anormais, classificadas de acordo com o tipo de defeito apresentado (maior ou menor) (CHENOWETH, 2005). Ao final, calcula-se a proporção de células normais e anormais e, com esse resultado, é possível obter um dos parâmetros para avaliar a qualidade do sêmen. Em ovinos, é desejável que o macho apresente $\geq 80\%$ de espermatozoides normais e $\leq 10\%$ de espermatozoides com defeitos maiores (CBRA, 2013). Outros métodos de classificação também podem ser aplicados, como por exemplo uma sequência de perguntas que podem ser respondidas de acordo com a característica dos espermatozoides avaliados (WHO, 2021). Todo ejaculado possui uma porcentagem de espermatozoides anormais e a incidência dessas anormalidades está relacionada tanto a fatores endógenos (como idade e o processo de maturação espermática), quanto fatores exógenos (como estresse térmico do ambiente ou osmolaridade do meio diluidor) (AX *et al.*, 2000). A morfologia também pode indicar diferentes problemas reprodutivos nos machos, sendo estes causados por influências do ambiente ou até problemas genéticos (CHENOWETH, 2005; SURIYASOMBOON *et al.*, 2005).

A avaliação da integridade de membrana plasmática pode ser realizada através da utilização de corantes vitais e sondas, assim como pela utilização do teste hiposmótico. A associação de duas sondas - iodeto de propídeo (não permeável à membrana) e laranja de acridina (permeável à membrana) - permite a análise da integridade física da membrana com resultados confiáveis e rápidos (YÁNIZ *et al.*, 2013). Ambas as sondas se ligam aos ácidos nucleicos, mas o iodeto de propídeo por não ser permeável, é internalizado apenas pelas células que possuem lesão em sua membrana. Já a laranja de acridina é permeável e emite fluorescência verde. Neste teste, os espermatozoides são classificados como verde e vermelho, o que representa, respectivamente, íntegros e não íntegros (YÁNIZ *et al.*, 2013; ALFRADIQUE *et al.*, 2018). Já o teste hiposmótico permite que os espermatozoides sejam classificados com base na funcionalidade bioquímica de suas membranas plasmáticas. Em membranas

funcionais, um meio hiposmótico induz a entrada de água na célula, em uma tentativa desta de se equilibrar osmoticamente com o exterior. Nos espermatozoides, a entrada de água faz com que a cauda de uma célula íntegra apresente entumescimento, o que faz com que ocorra enrolamento de sua cauda. Assim, espermatozoides com cauda enrolada possuem membrana bioquimicamente íntegra, enquanto aqueles que apresentam cauda reta possuem alguma lesão de sua membrana (JEYENDRAN *et al.*, 1984).

Também é possível avaliar regiões importantes do espermatozoide, como o acrossoma, que após entrar em contato com a zona pelúcida, libera seu conteúdo, resultando na sinalização que permite a interação oócito-espermatozoide e, conseqüentemente, a fertilização (FLORMAN *et al.*, 2008). Dessa forma, é importante avaliar a ocorrência de danos na membrana acrossômica, que podem levar à perda de sua função. Para isso, foram desenvolvidas diferentes técnicas de avaliação do status acrossomal (que está relacionado à capacitação), com a utilização, por exemplo, de corantes (como rosa bengala, giemsa e azul Trypan), lecitinas e clortetraciclina (CTC) para, (SANTOS *et al.*, 2015; STIVAL *et al.*, 2016; RUI *et al.*, 2017). É possível classificar os espermatozoides da seguinte forma: não capacitados (fluorescência uniforme por toda a cabeça), capacitados (faixa sem fluorescência na região pós-acrossomal) e com acrossoma reagido (fluorescência quase inexistente na cabeça, com apenas uma faixa brilhante na região equatorial ou apenas a peça intermediária com fluorescência) (WARD E STOREY, 1984; CORMIER *et al.*, 1997).

Para que ocorra o correto funcionamento das células eucarióticas, complexas funções bioquímicas ocorrem, como a atividade mitocondrial, que resulta na produção de ATP, vital para as atividades celulares (AMARAL *et al.*, 2013). Os espermatozoides necessitam que sua atividade mitocondrial seja mantida para que haja batimento dos flagelos e, assim, a possibilidade de movimentação no trato reprodutivo da fêmea para a fertilização (FOLGERØ *et al.*, 1993). Para se avaliar a atividade mitocondrial dos espermatozoides é possível se utilizar a sonda MitoTracker Green[®], que marca apenas células vivas e é seletiva à mitocôndria, a qual acumula esta sonda em seu interior (MARQUES-SANTOS *et al.*, 2003; DRUART *et al.*, 2009).

As células produzem subprodutos de suas reações, como espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* - ROS), que em concentrações fisiológicas possuem um importante papel nas funções celulares (KODAMA *et al.*, 1996). No entanto, quando há aumento nas ROS – resultante de um estresse oxidativo – ocorrem danos devido à peroxidação lipídica, a qual os espermatozoides são especialmente suscetíveis devido à presença de ácidos graxos poli-insaturados e baixos níveis de antioxidantes (KODAMA *et al.*, 1996). Para avaliar a taxa de lipoperoxidação das células espermáticas, é possível utilizar a técnica de espectrofotometria na leitura da coloração rósea gerada pela reação entre as moléculas de ácido tiobarbitúrico e malonaldeído, assim como utilização de sondas como BODIPY (SARLÓS *et al.*, 2002; DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO *et al.*, 2010; CORREIA *et al.*, 2021).

Além de todas essas análises, é possível também avaliar a capacidade dos espermatozoides de fertilizar, realizando-se IA ou então a fertilização *in vitro* (FIV) (MOORE *et al.*, 2005; PAU *et al.*, 2020). No entanto, há também outra técnica que já teve sua acurácia demonstrada: a avaliação da ligação dos espermatozoides à membrana perivitelínica de ovo de galinha (BARBATO *et al.*, 1998; CAMPOS *et al.*, 2017; CORREIA *et al.*, 2021). Essa técnica permite uma boa predição da capacidade dos espermatozoides de fertilizar, mesmo diante das limitações (por exemplo, por não se tratar de uma fertilização de fato e por não ser possível a avaliação da qualidade embrionária) (BARBATO *et al.*, 1998; YANG *et al.*, 2021). A utilidade dessa técnica é considerada pelo fato de existirem algumas similaridades entre as glicoproteínas presentes na membrana perivitelínica com aquelas presentes na zona pelúcida (ZP) de mamíferos (ROBERTSON *et al.*, 2000). A presença de glicoproteínas da ZP 1 e ZP3, homólogas às presentes na ZP de mamíferos e importantes na fertilização, permite que espermatozoides de outras espécies se liguem à membrana perivitelínica (WACLAWEK *et al.*, 1998; BAUSEK *et al.*, 2000). Com isso, é possível prever a capacidade de fertilizar, sem a necessidade de utilização de oócitos (DE ARAUJO *et al.*, 2015).

1.2.4 Criopreservação

Acredita-se que a primeira observação dos efeitos da baixa temperatura em espermatozoides foi feita em 1776 por Lazzaro Spallanzani, após observar que as células se tornavam imóveis após serem refrigeradas com neve (SHERMAN, 1964). Com o avanço dos estudos na área de reprodução, assim como das biotecnologias utilizadas, passou-se a estudar uma alternativa para manter os gametas criopreservados e serem utilizados em momento oportuno, flexibilizando a aplicabilidade das biotecnologias reprodutivas (RODRIGUEZ-WALLBERG *et al.*, 2019). Em humanos, além do uso da preservação de gametas para se flexibilizar o momento em que as pessoas poderão vir a ter filhos, estudos também têm sido realizados para a preservação de tecidos ovarianos e testiculares em casos de tratamentos agressivos – como quimio e radioterapia – em indivíduos em idade reprodutiva, ou até mesmo antes desse período, para permitir que no futuro possam vir a ter descendentes (ONOFRE *et al.*, 2016). Já na área animal, a criopreservação tem se mostrado uma aliada na produção animal junto a outras biotecnologias, principalmente na aceleração da genética do rebanho, além de permitir a formação de criobancos de germoplasma, seja de espécies domésticas ou ameaçadas de extinção (FICKEL *et al.*, 2007; UGUR *et al.*, 2019). Para isso, inúmeros estudos têm sido realizados visando o aprimoramento dos protocolos de criopreservação, seja em humanos ou animais. Na criopreservação de sêmen, diferentes técnicas foram desenvolvidas para se realizar a preservação das células. Essas técnicas variam tanto em relação à velocidade de redução da temperatura, quanto ao próprio meio em que o sêmen necessita ser adicionado (ALJASER *et al.*, 2022).

O congelamento lento e a vitrificação são duas técnicas de criopreservação de sêmen, sendo a primeira a mais utilizada (KUMAR *et al.*, 2019). No congelamento lento, a técnica pode ser realizada de forma manual ou automática, sendo a última com auxílio de máquinas de congelamento (ERDMANN *et al.*, 2020). Para isso, são utilizadas palhetas próprias para essa finalidade (0,25 ou 0,50 mL), que são preenchidas com o sêmen já diluído em meios contendo crioprotetores, seladas, passam um processo de refrigeração e posteriormente são armazenadas em nitrogênio líquido (BEZERRA *et al.*, 2012). Nesta técnica é importante que a redução de temperatura seja controlada, não sendo rápida demais, para que não haja danos pela formação de cristais

intracelulares, e nem muito lenta, pois assim levará a danos devido à desidratação celular. A técnica para descongelamento do sêmen também é crucial, já que taxas de descongelamento menores que a faixa de -60 °C a -5 °C podem levar à recristalização, com formação de cristais maiores, enquanto taxas maiores que os desta faixa podem levar a um desbalanço osmótico, com consequente entrada de água na célula (KUMAR *et al.*, 2019). Já o resfriamento ultrarrápido de sêmen (comumente denominado como vitrificação) é uma técnica que tem como princípio a conversão do líquido para um estado vítreo, resultando em menor formação de cristais de gelo, por meio de altas taxas de resfriamento (BÓVEDA *et al.*, 2018). Assim, as principais vantagens da vitrificação incluem a redução de danos causados devido à menor formação de cristais intracelulares, o menor tempo necessário para sua realização e o menor custo, já que dispensa a utilização de equipamentos, como as máquinas de congelamento (KUMAR *et al.*, 2019). Para que se atinjam esses resultados na técnica convencional de vitrificação, é necessária a utilização de altas concentrações de crioprotetores, o que é um fator limitante principalmente para as células espermáticas, devido aos efeitos tóxicos e osmóticos destas altas concentrações (ISACHENKO *et al.*, 2004).

Tanto para o congelamento lento, quanto para a vitrificação, há a necessidade de se utilizarem substâncias que protejam as células do processo realizado, já que toda a manipulação – incluindo-se diluição, resfriamento, congelamento/vitrificação e descongelamento/aquecimento – gera estresse celular (BALDI *et al.*, 2020). Dessa forma, foram desenvolvidos meios conhecidos como diluidores, que contêm substâncias crioprotetoras, classificadas como permeáveis e não-permeáveis, e que visam reduzir os efeitos causados por esses processos. Os crioprotetores permeáveis são pequenas moléculas não iônicas, que entram nas células e conferem proteção à estrutura intracelular, sendo os mais utilizados o glicerol e o dimetilsulfóxido (DMSO) (SIEME *et al.*, 2016). Apesar de conferirem crioproteção, se utilizados em altas concentrações são tóxicos e, para se mitigar essa toxicidade, são associados com crioprotetores não-permeáveis, como a sacarose, que permanecem fora da célula e controlam a osmolaridade do meio extracelular (HEZAVEHEI *et al.*, 2018; ALJASER, 2022). Também é possível adicionar aos

meios outras substâncias que agem através de diferentes mecanismos, como as proteínas anticongelantes (que inibem a recristalização) e os antioxidantes (que reduzem os danos causados pela produção de ROS); assim como manipular a composição lipídica da membrana por meio da adição de colesterol para torná-la mais estável (CORREIA *et al.*, 2021; RIESCO *et al.*, 2021; YANG *et al.*, 2021). No entanto, o processo de criopreservação e, principalmente os meios, necessitam ser aprimorados de forma específica, já que há variações de características que são intrínsecas a cada espécie (HOLT, 2000).

Em carneiros, a criopreservação de sêmen também tem sido estudada, com o intuito de se aprimorar cada vez mais a técnica nessa espécie. A técnica de congelamento lento se mantém como a mais frequentemente aplicada, utilizando-se tanto máquinas de congelação, quanto método manual com auxílio de isopor (JHA *et al.*, 2019; VOZAF *et al.*, 2022). Em relação aos meios diluidores, foram desenvolvidos protocolos utilizando-se diferentes crioprotetores e composições. Os meios podem ser preparados nos laboratórios, mas também há alguns crioprotetores comerciais que são utilizados tanto para bovinos quanto para carneiros (VOZAF *et al.*, 2022). Há uma variedade de estudos que procuram melhorar a criopreservação de sêmen em ruminantes, já que os resultados possivelmente ainda não atingiram seu potencial máximo (PERIS-FRAU *et al.*, 2020). Além da variação devido às características da espécie, uma das principais causas da redução da motilidade e viabilidade espermática ocorre devido aos danos que as células sofrem, principalmente durante o processo de congelamento (HOLT, 2000). Há, então, uma busca constante de substâncias que aumentem a crioproteção dos espermatozoides, visando melhorar sua sobrevivência à criopreservação.

1.2.5 Efeitos da criopreservação no sêmen

O congelamento de sêmen já demonstrou ser uma ferramenta de grande importância na reprodução assistida. No entanto, toda a manipulação necessária para congelar os espermatozoides leva ao estresse dessas células e, conseqüentemente, a alterações negativas em suas funções (BALDI *et al.*, 2020). Esses danos podem ser físicos, como nas membranas plasmática e

acrossomal, assim como bioquímicos e genéticos (PERIS-FRAU *et al.*, 2020). Por isso, é importante conhecer esses efeitos para que seja possível desenvolver táticas para minimizá-los obtendo-se melhores amostras para a posterior fertilização.

A membrana plasmática é a primeira estrutura a sofrer com os danos causados pela mudança de temperatura, já que o congelamento leva ao rearranjo dos fosfolípidos e alteração nas interações entre lipídeos, proteínas e carboidratos, assim como há perda de algumas proteínas de superfície e de membrana (BAILEY *et al.*, 2000; PERIS-FRAU *et al.*, 2020). Além dos danos causados pela redução da temperatura em si, o aumento na produção de ROS provoca não apenas a lipoperoxidação, como também redução nas pontes dissulfeto entre as proteínas e alteração no glicocálix, o que leva à fragilidade da membrana e perda de sua propriedade semipermeável (PERIS-FRAU *et al.*, 2020). A formação de cristais de gelo no interior das células também é responsável por causar dano mecânico às membranas, resultando em seu rompimento (LV *et al.*, 2019).

Outra estrutura que sofre danos com o processo de criopreservação são as mitocôndrias. Seu principal papel de produção de energia na célula possui estreita relação com a motilidade dos espermatozoides, sendo crucial para a fertilização dos oócitos (AMARAL *et al.*, 2013). No entanto, a mitocôndria também é fonte de ROS, que são produzidas principalmente na cadeia de transferência de elétrons durante a produção de ATP (AMARAL *et al.*, 2013). Essa produção de forma controlada é importante para algumas funções das células espermáticas, como motilidade, reação acrossomal e capacidade fertilizante (KOTHARI *et al.*, 2010). A formação de cristais de gelo e desbalanço osmótico que ocorrem durante a criopreservação causam danos nas mitocôndrias, o que leva à redução na motilidade dos espermatozoides, assim como aumento na produção de ROS devido ao estresse oxidativo (PERIS-FRAU *et al.*, 2020). Como resultado, essas alterações levam à queda da viabilidade e funcionalidade espermática, com consequente redução da qualidade dessas células.

A criocapacitação também influencia a viabilidade dos espermatozoides que sobrevivem ao congelamento. O espermatozoide adquire sua capacidade

fertilizante após passar por um processo denominado capacitação, que se inicia após a ejaculação, no trato reprodutor feminino e, com isso, as células se tornam capazes de realizar a reação acrossomal, necessária para a fertilização (DAVIS, 1981). No entanto, durante a criopreservação as alterações nas membranas (plasmática e acrossomal) podem levar a maior sensibilidade do espermatozoide ao meio em que está presente, levando à capacitação (portanto o termo: criocapacitação) e reação acrossomal de forma precoce de algumas células, que se tornam incapazes de realizar a fertilização (BAILEY *et al.*, 2000).

Estudos também já demonstraram que há alteração no material genético (redução de mRNAs, modificação de metilações e histonas) durante a manipulação *in vitro*, inclusive durante o processo de criopreservação, sendo esta alteração atribuída como principal causa a produção em excesso de ROS (PERIS-FRAU *et al.*, 2020). Espermatozoides com o DNA fragmentado ainda podem conseguir se locomover e fertilizar oócitos (FATEHI *et al.*, 2006). No entanto, o embrião gerado a partir dessa fertilização costuma ter menor qualidade e não seguir seu desenvolvimento completo ou, em alguns casos, pode gerar descendentes com alterações fisiológicas diversas a longo prazo (FATEHI *et al.*, 2006; FERNÁNDEZ-GONZALEZ *et al.*, 2008).

Os espermatozoides ovinos possuem algumas características que os tornam mais suscetíveis aos danos causados durante a criopreservação. As células desses animais são particularmente sensíveis à criopreservação quando comparadas a outros ruminantes domésticos (PERIS-FRAU *et al.*, 2020). Dentre as razões que justificam essa maior sensibilidade, está o fato de que os espermatozoides ovinos possuem uma maior proporção de fosfolípidios poli-insaturados, que não apenas reduzem a resistência da membrana ao processo de criopreservação, mas também a tornam mais suscetível a ataques de ROS (PERIS-FRAU *et al.*, 2020; VOZAF *et al.*, 2022). O aumento da produção de ROS devido ao processo de criopreservação associado com a diluição do sêmen resulta em uma ação ineficiente dos antioxidantes presentes no plasma seminal e, junto aos outros danos causados no congelamento de sêmen, causam significativa perda de viabilidade dos espermatozoides (PERIS-FRAU *et al.*, 2020).

Com esses desafios no congelamento de gametas, a busca por substâncias crioprotetoras que consigam reduzir os danos causados durante a criopreservação, assim como aumentar sua eficiência, ainda se faz altamente necessária. Dessa forma, uma das estratégias propostas para a melhoria da congelabilidade do sêmen ovino é a adição de antioxidantes ao meio de congelação para tentar neutralizar a ação do excesso de ROS e reduzir os danos causados pelas mesmas (PEZO *et al.*, 2021).

1.3 Espécies reativas de oxigênio na célula espermática

Em organismos aeróbios, o oxigênio (O_2) é importante na geração de energia na maioria das células, mas também é prejudicial para as mesmas, o que é visto como um paradoxo. Durante a produção de energia pelas mitocôndrias, o O_2 passa pela cadeia transportadora de elétrons, sendo reduzido até a produção de uma molécula de água (H_2O). No entanto, pode ocorrer escape de algumas das moléculas durante esse processo, que são conhecidas como ROS (TADROS E VIJ, 2019). Sabe-se que as ROS são prejudiciais às células e às próprias mitocôndrias, por reagirem com diferentes estruturas e prejudicarem seu funcionamento (PERIS-FRAU *et al.*, 2020). Para isso, as próprias células possuem mecanismos protetores contra a oxidação, tanto enzimáticos (por exemplo, a partir da ação da superóxido dismutase) quanto não enzimáticos (por exemplo, pela ação da glutatona). A homeostase entre ROS e antioxidantes se dá pelas reações de oxidação-redução (redox) (SADEGHI *et al.*, 2022).

Apesar de serem consideradas prejudiciais, as ROS possuem papel importante nas células quando estão em concentrações fisiológicas, inclusive nos espermatozoides. Nas células em geral, as espécies pró-oxidantes funcionam como mensageiras secundárias, além de participarem da ativação apoptótica e regulação embrionária (DREVET E AITKEN, 2020; XIAO E LOSCALZO, 2020). Já nos espermatozoides, as ROS participam de diferentes eventos, como no processo de maturação, em que há compactação da cromatina, assim como na capacitação e ligação do espermatozoide à zona pelúcida (AITKEN *et al.*, 2012). No entanto, quando há uma perda no equilíbrio

entre a quantidade de ROS produzidas e os mecanismos antioxidantes, ocorrem danos nas células espermáticas (GIBB *et al.*, 2020). Durante a criopreservação, há danos nas mitocôndrias e conseqüente extravasamento de ROS, sendo estas principalmente, ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\cdot}). Nesse caso, diferentes estruturas como a membrana plasmática e o material genético, são afetadas pelas ROS e isso leva à redução da viabilidade dos espermatozoides (AGARWAL *et al.*, 2018; GIBB *et al.*, 2020; PERIS-FRAU *et al.*, 2020).

Na tentativa de reduzir os danos causados pelo excesso de produção de ROS durante o congelamento de sêmen ovino, estudos têm testado diferentes substâncias antioxidantes no meio diluidor (SOUZA *et al.*, 2019; ROSTAMI *et al.*, 2020). Há interesse principalmente em extratos de determinadas plantas devido às suas características antioxidantes, geralmente provenientes de uma ou mais substâncias abundantes no extrato. Alguns desses estudos têm produzido melhores resultados em alguns parâmetros no pós-descongelamento do sêmen, com maior viabilidade dos espermatozoides (ROS-SANTAELLA *et al.*, 2021). Das 45 espécies de plantas revisadas por Ros-Santaella *et al.* (2021), alguns dos resultados observados na sua utilização na criopreservação de sêmen foram: 80% (36/45) apresentaram resultados positivos na motilidade espermática; 38% (17/45) e 29% (13/45) tiveram efeitos positivos na redução da lipoperoxidação e na atividade antioxidante, respectivamente. Recentemente, o trans-anetol (presente em algumas espécies de plantas) tem sido uma substância testada na criopreservação de sêmen em algumas espécies, mas ainda com poucos relatos de seus efeitos.

1.4 Trans-anetol (AN)

O anetol [1-metoxi-4-(1-propenil)-benzeno] é uma substância presente em extratos oleosos de mais de 20 espécies diferentes de plantas e pode ser encontrado tanto nas formas cis e trans. O trans-anetol é o isômero mais abundante nos extratos de algumas espécies de plantas, principalmente da erva-doce (*Foeniculum vulgare*) e anis estrelado (*Illicium verum* Hook.f.), e é também o mais utilizado em estudos para seu uso terapêutico e nas indústrias.

Neste último caso, a preferência pelo isômero trans se explica pelo fato deste possuir características de interesse para as indústrias, como sua ação flavorizante. Além de ser utilizado em alimentos, o AN também é usado em perfumes e produtos farmacêuticos (DIAO *et al.*, 2014; APROTOSOAIÉ *et al.*, 2016). Outras características também têm levado ao maior interesse no estudo do AN, como suas propriedades anti-inflamatória, analgésica, antidepressiva e antioxidante (CHOI E HWANG, 2004; KANG *et al.*, 2013; HASSANZADEH *et al.*, 2022). Isso pode justificar o uso de plantas como a erva-doce e anis-estrelado na fitoterapia para problemas digestivos e respiratórios, por exemplo (MARINOV E VALCHEVA-KUZMANOVA, 2015).

Devido aos aspectos positivos do uso dessas plantas, assim como sua propriedade antioxidante, alguns estudos têm utilizado o extrato de *F. vulgare* na criopreservação de sêmen para investigar seus efeitos nos espermatozoides após o descongelamento (MALO *et al.*, 2011; MONTÓN *et al.*, 2015; NAJAFI *et al.*, 2019). Estes autores, em sua maioria, relataram melhora na motilidade, integridade de membrana e acrossoma. No entanto, o uso de extratos de plantas pode levar a algumas dificuldades na replicabilidade, como diferenças na origem geográfica das plantas, método de extração utilizado, além das partes e estágio de maturação utilizados (LEAL *et al.*, 2013; DIAO *et al.*, 2014). Com relação ao AN adquirido em laboratório (denominado aqui como AN purificado), apesar de ter composição fixa e, portanto, os resultados da sua utilização serem potencialmente mais homogêneos, seus efeitos no sêmen ainda são incipientes na literatura, com relatos de efeitos controversos (LUO *et al.*, 2020; SOUSA *et al.*, 2021), conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Estudos que utilizaram diferentes fontes contendo trans-anetol na sua composição na preservação de sêmen.

Referência	Espécie	Origem	Concentrações	Resultados (vs. controle)
Malo <i>et al.</i> , 2011	Suína	Extrato de erva-doce	2,5; 5 e 10 g/L	2,5; 5 e 10 g/L: maior motilidade pós descongelamento
Montón <i>et al.</i> , 2015	Suína	Extrato de erva-doce	2,5; 5 e 10 g/L	2,5; 5 e 10 g/L: maior motilidade progressiva, viabilidade e integridade acrossomal após descongelamento
Najafi <i>et al.</i> , 2019	Ovina	Extrato de erva-doce	0, 5, 10 e 15 mg/L	10 mg/L: maior motilidade total e progressiva, VSL e integridade de membrana e atividade mitocondrial pós descongelamento 5 e 10 mg/L: menores valores de MDA pós descongelamento
Luo <i>et al.</i> , 2020	Humana	Trans-anetol purificado (Merck Millipore)	0,1; 1; 10 e 100 µM	10 e 100 µM: menor motilidade, hiperativação, e capacidade de penetração dos espermatozoides. Menor fosforilação de tirosina tanto basal quanto a induzida por progesterona, menor influxo de $[Ca^{2+}]$ e menor corrente do CATSPER
Sousa <i>et al.</i> , 2021	Caprina	Trans-anetol purificado (Sigma-Aldrich)	30 (200 µM), 300 (2 mM), e 2000 (13 mM) µg/mL	Todos: aumento de patologias espermáticas, sem diferença nos parâmetros cinéticos. 2000 µg/mL: menos ROS e maior número de espermatozoides viáveis sem ROS pós descongelamento

VSL – Velocidade linear, MDA - malonaldeído, Ca^{2+} - cálcio, CATSPER – *cation channel of sperm* (canal de cátion de espermatozoide), ROS – *reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigênio)

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo foi determinar o efeito da adição de diferentes concentrações de trans-anetol purificado na criopreservação de sêmen ovino.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da adição de trans-anetol comercial no meio de congelamento no(a)(s):

- 2.1.1** Parâmetros cinéticos de motilidade;
- 2.1.2** Características morfológicas dos espermatozoides;
- 2.1.3** Integridade de membrana plasmática e acrossomal;
- 2.1.4** Atividade mitocondrial dos espermatozoides;
- 2.1.5** Capacidade fecundante, por meio da sua capacidade de ligação à membrana perivitelínica;
- 2.1.6** Estresse oxidativo, através da lipoperoxidação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 APROVAÇÃO ÉTICA, LOCAL E ANIMAIS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Fluminense (3538120222). O experimento foi conduzido durante o período reprodutivo (abril e maio) na Unidade de Pesquisa Experimental em Caprinos e Ovinos (UniPECO - 22° S, 42° O), localizada em Cachoeiras de Macacu, Brasil.

Após avaliação clínica e andrológica (CBRA, 2013), foram selecionados e utilizados seis carneiros adultos da raça Santa Inês para coleta de sêmen. Os animais ficaram sob as mesmas condições até o final do experimento, com luz natural, acesso a pasto e recebendo concentrado de acordo com as necessidades nutricionais. Água e sal mineral ficaram disponíveis *ad libitum*.

3.2 REAGENTES

Os reagentes utilizados, incluindo o trans-anetol (cat # 117870), foram adquiridos na Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EUA) salvo indicação alternativa. A gema utilizada para o preparo do meio Tris-gema era pasteurizada (Fleischmann, Brasil) e adquirida em um supermercado local. Para realização do teste de ligação à membrana perivitelínica, os ovos também foram adquiridos em um supermercado local.

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado em um total de sete dias de coleta de sêmen para cada animal. A unidade experimental deste estudo foi o ejaculado (n=30). Ejaculados com motilidade $\geq 80\%$ e parâmetros dentro dos padrões da espécie (volume 0,5 a 3 mL; movimento de massa ≥ 3 e vigor ≥ 3) foram selecionados (CBRA, 2013). Estes foram coletados a partir de seis carneiros, por vagina artificial, somando-se quatro a seis ejaculados por carneiro. Cada ejaculado foi

dividido em quatro alíquotas, sendo estas diluídas em meio Tris-gema contendo trans-anetol de acordo com os seguintes tratamentos: CONT (0 μM , grupo controle), AN10 (10 μM), AN50 (50 μM) e AN100 (100 μM). A concentração final de espermatozoides no meio foi de 400×10^6 spz/mL.

Após as diluições (pré-congelamento), em cada tratamento foram realizadas as seguintes análises: cinética espermática, integridade de membrana plasmática, atividade de membrana (teste hiposmótico), atividade mitocondrial e morfologia espermática. Imediatamente após o descongelamento (0 h), os mesmos parâmetros foram avaliados, além de status acrossomal, ligação à membrana perivitelínica e quantificação da lipoperoxidação dos espermatozoides.

3.4 CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO

O diluidor utilizado foi o meio Tris-gema (3,63 g de TRIS, 0,50 g de glicose, 1,99 g de ácido cítrico, 15 mL de gema de ovo, 100.000 UI de penicilina, 100 mg de estreptomicina, 5% de glicerol, água destilada para 100 mL, pH 7,4 e 985 mOsm/kg), adicionado ou não de AN, de acordo com o tratamento. Após a diluição em cada tratamento, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 mL previamente identificadas e próprias para o congelamento de sêmen, que foram então seladas com álcool polivinílico. Para o congelamento, foi utilizada máquina com sistema de congelação automático, TK 3000[®] (TK Tecnologia em Congelação Ltda, Uberaba, MG, Brasil). A curva foi programada para realizar a refrigeração do sêmen a 0,25 °C/min até 5 °C, temperatura na qual as palhetas foram mantidas por 4 h. Para o congelamento, foi utilizada curva com velocidade -20 °C/min até chegar à temperatura de -120 °C. Imediatamente após, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido, organizadas em racks e armazenadas em cilindro criogênico a -196 °C até descongelamento. O descongelamento foi realizado em banho-maria a 37 °C por 30 s, sendo descongelada uma palheta de cada grupo por animal.

3.5 ANÁLISES MICROSCÓPICAS

3.5.1 Cinética espermática

Esta análise foi realizada com o auxílio do CASA (*Computer-assisted semen analysis*) utilizando o sistema SCA® (*Sperm Class Analyzer*, Microptic, Nikon Eclipse Ci, Tokyo, Japan). O programa foi calibrado para detecção de sêmen de carneiro. O tamanho da cabeça detectável pelo programa foi configurado em parâmetro padrão entre 18 e 60 μm^2 . Um total de 25 imagens por segundo foram capturadas e o aumento utilizado no microscópio foi de $\times 100$. As mensurações foram realizadas com lamínula de 24 x 24 mm com uma gota de 10 μL de amostra. Espermatozoides foram identificados da seguinte forma: imóvel, quando a velocidade curvilínea (VCL) era menor que 10 $\mu\text{m/s}$; células com VCL entre 10 e 45 $\mu\text{m/s}$ foram classificadas como lentas; entre 45 e 75 $\mu\text{m/s}$, foram classificadas como velocidade média e, acima de 75 $\mu\text{m/s}$, classificadas como rápidas (CORREIA *et al.*, 2021). Espermatozoides com retilinearidade (STR) acima de 80% foram considerados com motilidade progressiva. Ejaculados foram analisados, individualmente, para os seguintes parâmetros: motilidade total (%), motilidade progressiva (%), espermatozoides com velocidade rápida, média e lenta (%), velocidade média de percurso (VAP), VCL, velocidade linear (VSL), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência do batimento cruzado (BCF), STR, linearidade (LIN) e coeficiente de oscilação (WOB).

3.5.2 Teste hiposmótico

Para este teste, alíquotas de 15 μL de sêmen foram colocadas em microtubos com 500 μL de solução hiposmótica de 100 mOsm/kg (água MiliQ). Em seguida, foram incubadas por 20 min a 37 °C e avaliadas por meio de preparação úmida em lâmina coberta com lamínula. A análise foi realizada em microscópio de contraste de fase (Nikon Eclipse Ci, Nikon Corporation - Japan) em aumento de $\times 200$. Espermatozoides com cauda enrolada foram classificados como membrana funcional, enquanto aqueles com cauda reta foram classificados como membrana funcionalmente anormal. Pelo menos 200 células foram contadas para cada ejaculado (sem descontar espermatozoides com cauda enrolada identificados na morfologia) (RAMU E JEYENDRAN, 2013).

3.5.3 Integridade de membrana

Esta análise foi realizada em microscópio de epifluorescência (Nikon Eclipse Ci- Nikon Corporation - Japan), de acordo com Alfradique *et al.* (2018). Duas sondas foram utilizadas: laranja de acridina (cat # A9231) e iodeto de propídio (cat # P4170). A laranja de acridina foi diluída 1:10.000 em água destilada, v/v]; e o iodeto de propídio foi utilizado na concentração de 0,5 mg/mL, diluído em DMSO. A laranja de acridina é uma sonda permeável à membrana e é seletiva aos ácidos nucleicos, marcando as células com fluorescência verde. Já o iodeto de propídio é uma sonda não permeável e se liga aos ácidos nucleicos, emitindo fluorescência vermelha. Para análise, uma gota da amostra junto com uma gota de cada sonda, foram colocadas em lâminas, selada com lamínula e avaliada utilizando-se microscopia de fluorescência (Nikon Eclipse Ci, Nikon Corporation – Japan) em aumento de $\times 100$. Para avaliação, foi utilizado filtro de 465–495 nm (excitação) e 515–555 nm (emissão). Pelo menos 200 células foram analisadas por amostra avaliada, sendo classificadas da seguinte forma: membrana intacta (verde) ou lesada (vermelha).

3.5.4 Atividade mitocondrial

Para marcação da atividade mitocondrial, foi utilizado o MitoTracker Green (cat # M7514). Esta sonda consiste em um fluorocromo que marca apenas as mitocôndrias de espermatozoides vivos (DRUART *et al.*, 2009). Uma solução de trabalho foi previamente preparada, com 4 mL de salina tamponada e 10 μ L de MitoTracker, chegando a uma concentração final de 20 μ M. O sêmen (10 μ L) foi incubado em 90 μ L de solução de MitoTracker a 37 °C durante 30 min. Para a análise, foi utilizado microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse Ci, Nikon Corporation – Japan) com filtro de excitação de 488 nm e 516 nm de emissão em aumento de $\times 200$. Os espermatozoides foram classificados como com (presença de fluorescência verde na peça intermediária) ou sem (ausência de fluorescência) atividade mitocondrial. Pelo menos 200 células foram contadas por ejaculado.

3.5.5 Status acrossomal

O status acrossomal foi avaliado utilizando coloração com CTC, como descrito anteriormente (CORMIER *et al.*, 1997; ALFRADIQUE *et al.*, 2018), com algumas modificações. Foi preparada uma solução de trabalho com 0,75 mM de CTC (pH 7,8) em uma solução tampão contendo 20 mM de Tris, 130 mM de NaCl e 5 mM de cisteína. A amostra de sêmen foi misturada com um volume igual de solução de CTC (5 µL) e, após alguns segundos, 2 µL de paraformaldeído a 2% foi adicionado. As células foram observadas com filtro azul-violeta 2 A (BV-2 A) com 400–440 nm de excitação e 470 nm de emissão de fluorescência (Nikon Eclipse Ci, Nikon Corporation – Japan). Os espermatozoides foram classificados com o critério proposto por Cormier *et al.* (1997): brilho de fluorescência em toda a cabeça (não-capacitado), faixa sem fluorescência na região pós-acrossomal (capacitado) e fluorescência em toda a cabeça com fina faixa brilhante de fluorescência ao longo da região equatorial (células com acrossomo reagido). Pelo menos 200 espermatozoides foram contados por ejaculado.

3.5.6 Teste de ligação à membrana perivitelínica

Este teste foi realizado como proposto por Barbato *et al.* (1998) e Campos *et al.* (2017). Membranas perivitelínicas foram obtidas a partir de ovos de galinha frescos e não fertilizados, e seu preparo foi realizado separando-se a gema da albumina, utilizando papel filtro. As gemas intactas foram colocadas em filme plástico de parafina (Parafilm®) e a membrana foi separada e lavada com PBS. Em seguida, a membrana foi colocada em placa de petri e cortada em quadrados de 0,5 cm². Foi utilizado um fragmento de membrana para cada tratamento. A membrana foi coberta com 1 mL de FERT-TALP e foi adicionada uma alíquota de 20 µL de amostra (8×10^6 sptzs totais) de cada ejaculado com cada tratamento. A membrana com a amostra de sêmen foi incubada por 1 h a 38,5 °C com 5% de CO₂. Após a incubação, a membrana foi lavada três vezes com PBS. Em seguida, foi colocada em uma lâmina com 1 µL de Hoechst 33342 (1 mg/mL) e coberta com lamínula, atentando-se para a não formação de dobras, selando e protegendo da luz. Foram contados espermatozoides em cinco campos por amostra e os resultados de ligação são expressos em mm² de membrana (BARBATO *et al.*, 1998; BRITO *et al.*, 2016).

3.5.7 Morfologia espermática

Para esta análise, uma solução de paraformaldeído a 2% foi previamente preparada (4% de paraformaldeído em PBS, em proporção de 1:1). Uma alíquota de 10 µL de sêmen foi adicionada em 120 µL de paraformaldeído a 37 °C e as amostras foram mantidas a 4 °C até avaliação. Para a leitura, uma gota da amostra diluída foi colocada em uma lâmina e coberta com lamínula. Pelo menos 200 células foram contadas por ejaculado, utilizando-se microscopia de contraste de fase sob aumento de $\times 1000$ (Nikon Eclipse Ci, Nikon Corporation – Japan). Os espermatozoides anormais foram classificados em defeitos maiores e menores (CHENOWETH, 2005).

3.5.8 Lipoperoxidação

Esta análise foi realizada de acordo com Sarlós *et al.* (2002). O método se baseia no uso de espectrofotometria para a quantificação da coloração rosa produzida pela reação entre as moléculas do ácido tiobarbitúrico e malonaldeído. As reações ocorrem em pH ácido, em uma temperatura entre 90 °C e 100 °C. Alíquotas de 500 µL das amostras de cada tratamento e 1000 µL de solução 10% de ácido tiobarbitúrico foram centrifugados por 15 min a 1800 g, a uma temperatura de 15 °C, para a precipitação das proteínas. Alíquotas do sobrenadante foram colocadas em microtubos junto com ácido barbitúrico a 1% em proporção de 1:1 e dissolvidas em 0,05 N de hidróxido de sódio. Os tubos contendo essa mistura foram incubados em água fervente a 100 °C durante 10 min e então resfriadas em água com gelo a 0 °C. As Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) foram quantificadas em espectrofotômetro, em comprimento de 532 nm, e expressos em nanogramas de TBARS/mL de sêmen.

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises foram realizadas no programa IBM SPSS Statistics 27. Os dados foram comparados utilizando o modelo linear generalizado misto (GLMM), incluindo-se como efeitos fixos a concentração de AN, o animal, e a interação entre estes dois; e o dia de coleta como fator aleatório para correção do modelo. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos, e valores de $P \geq 0,05$ e \leq

0,1 foram considerados tendência. Parâmetros enquadrados nesses dois casos foram submetidos à análise de contrastes por Método Pairwise. Os dados são apresentados como média (\pm SEM).

4. RESULTADOS

4.1. PARÂMETROS PRÉ-CONGELAMENTO

Imediatamente após a diluição, não houve diferença ($P > 0,05$) nos grupos experimentais nos parâmetros avaliados (motilidade, cinética e morfologia espermática, integridade de membrana, teste hiposmótico e atividade mitocondrial) (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros (média \pm SEM) analisados em sêmen ovino após diluição (pré-congelamento) com meios contendo ou não trans-anetol (AN) purificado.

Parâmetros	Trans-anetol (μM)				P
	0	10	50	100	
Motilidade total (%)	99,8 \pm 0,4	99,5 \pm 1,5	99,9 \pm 0,2	99,8 \pm 0,3	0,995
Motilidade progressiva (%)	15,1 \pm 6,6	15,1 \pm 6,2	14,8 \pm 6,3	14,5 \pm 6,6	0,869
Velocidade rápida (%)	46,2 \pm 42,5	43,8 \pm 41,0	43,6 \pm 40,8	44,1 \pm 41,0	0,381
Velocidade média (%)	31,1 \pm 21,4	32,2 \pm 18,7	32,5 \pm 19,1	29,8 \pm 17,5	0,636
Velocidade lenta (%)	22,5 \pm 26,5	23,5 \pm 26,7	23,8 \pm 27,3	26,0 \pm 30,0	0,921
VCL ($\mu\text{m/s}$)	76,8 \pm 30,5	74,9 \pm 29,4	73,3 \pm 27,5	73,3 \pm 28,6	0,310
VSL ($\mu\text{m/s}$)	25,3 \pm 7,6	24,7 \pm 6,9	24,1 \pm 6,9	24,6 \pm 7,1	0,467
VAP ($\mu\text{m/s}$)	44,1 \pm 15,9	42,8 \pm 14,9	41,8 \pm 14,4	42,3 \pm 14,8	0,135
LIN (%)	34,8 \pm 6,4	34,9 \pm 7,3	33,0 \pm 7,3	35,4 \pm 6,3	0,176
STR (%)	59,1 \pm 6,3	59,5 \pm 6,8	59,0 \pm 5,6	59,7 \pm 6,1	0,683
WOB (%)	58,4 \pm 5,1	58,2 \pm 5,6	57,8 \pm 4,2	58,9 \pm 4,9	0,735
ALH (μm)	4,7 \pm 1,2	4,7 \pm 1,2	4,6 \pm 1,3	4,6 \pm 1,1	0,275

continua

Tabela 3, continuação

BCF (Hz)	5,3 ± 3,1	5,4 ± 3,2	5,4 ± 3,2	5,4 ± 3,2	0,702
Integridade de membrana plasmática (% íntegros)	74,6 ± 8,1	73,5 ± 9,1	76,1 ± 8,1	75,2 ± 7,7	0,393
Teste hiposmótico (% reativos)	71,5 ± 10,1	74,9 ± 10,2	75,1 ± 8,4	75,3 ± 9,5	0,130
Morfologia (% normais)	93,3 ± 3,3	91,0 ± 18,0	94,0 ± 3,0	87,7 ± 23,3	0,406
Atividade mitocondrial (% com atividade)	91,6 ± 5,2	91,3 ± 6,3	93,5 ± 4,4	91,7 ± 5,2	0,288

Não houve diferença em nenhum parâmetro para todos os tratamentos ($P > 0,05$). Abreviações: VCL: velocidade curvilínea; VSL: velocidade linear; VAP: velocidade média do percurso; LIN: linearidade; STR: retilinearidade; WOB: coeficiente de oscilação; ALH: amplitude do deslocamento lateral da cabeça; BCF: frequência do batimento cruzado.

4.2. PARÂMETROS PÓS DESCONGELAMENTO

4.2.1. Cinética espermática

Logo após o descongelamento, diferenças foram observadas em alguns parâmetros cinéticos (Tabela 4). Nos parâmetros de motilidade progressiva e velocidade média, o grupo AN100 foi superior aos demais ($P \leq 0,05$). Além disso, AN100 apresentou maior proporção de espermatozoides rápidos quando comparado ao CONT e AN10, e AN50 apresentou valores semelhantes tanto a CONT e AN10, quanto a AN100. Houve tendência de diferença verificada na análise global do modelo nos parâmetros VCL, VSL e VAP, sendo que na análise de contraste, houve significância detectada com superioridade nesses parâmetros no grupo AN100, em contraste com o grupo controle e/ou os demais (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros (média \pm SEM) de cinética espermática imediatamente após descongelamento de sêmen ovino criopreservado com meio contendo ou não trans-anetol (AN) purificado

Parâmetros	Trans-anetol (μM)				P
	0	10	50	100	
Motilidade total (%)	60,3 \pm 16,9	62,3 \pm 12,8	61,0 \pm 16,3	67,7 \pm 16,7	0,971
Motilidade progressiva (%)	9,9 \pm 7,6 ^a	11,0 \pm 8,3 ^a	9,6 \pm 7,0 ^a	12,5 \pm 7,2 ^b	0,011
Velocidade rápida (%)	15,3 \pm 13,4 ^a	13,8 \pm 12,3 ^a	14,9 \pm 11,5 ^{ab}	18,8 \pm 13,0 ^b	0,054
Velocidade média (%)	7,4 \pm 6,1 ^a	8,4 \pm 5,0 ^a	7,8 \pm 5,2 ^a	10,8 \pm 9,3 ^b	0,030
Velocidade lenta (%)	37,7 \pm 10,3	40,1 \pm 9,1	38,3 \pm 10,6	38,1 \pm 11,7	0,938
VCL ($\mu\text{m/s}$)	47,5 \pm 17,8 ^a	37,8 \pm 17,1 ^a	46,0 \pm 16,2 ^{ab}	50,9 \pm 16,2 ^b	0,080
VSL ($\mu\text{m/s}$)	21,2 \pm 8,9 ^a	20,4 \pm 9,3 ^b	20,4 \pm 8,4 ^b	22,9 \pm 8,9 ^a	0,081
VAP ($\mu\text{m/s}$)	29,9 \pm 12,0 ^a	28,5 \pm 11,6 ^a	29,0 \pm 11,0 ^a	32,4 \pm 11,5 ^b	0,058
LIN (%)	45,1 \pm 8,3	45,0 \pm 7,4	44,5 \pm 8,9	45,2 \pm 9,9	0,850
STR (%)	70,6 \pm 6,2	70,6 \pm 6,5	68,7 \pm 9,4	70,3 \pm 7,5	0,630
WOB (%)	63,4 \pm 7,1	63,3 \pm 5,9	63,0 \pm 7,2	63,6 \pm 7,6	0,792
ALH (μm)	3,3 \pm 0,8	3,4 \pm 0,8	3,2 \pm 0,7	3,4 \pm 0,6	0,575
BCF (Hz)	8,9 \pm 3,3	9,1 \pm 3,5	8,9 \pm 3,3	9,3 \pm 2,5	0,340

Na mesma linha, letras diferentes diferem significativamente para cada parâmetro. Abreviações: VCL: velocidade curvilínea; VSL: velocidade linear; VAP: velocidade média do percurso; LIN: linearidade; STR: retilinearidade; WOB: coeficiente de oscilação; ALH: amplitude do deslocamento lateral da cabeça; BCF: frequência do batimento cruzado. Letras diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$) na análise de contrastes por método Pairwise.

4.2.2 Avaliações morfológicas e funcionais

Não houve diferença ($P = 0,462$) entre grupos em relação ao teste de integridade de membrana (Figura 1A). No entanto, no teste hiposmótico foi detectada diferença entre os grupos ($P = 0,043$), sendo que amostras tratadas com AN100 apresentaram menor percentual de células com membrana funcional ($P < 0,05$) quando comparado aos grupos CONT e AN50 (Figura 1B). Não foram observadas alterações quanto à atividade mitocondrial ($P = 0,884$; Figura 2A), porém, a análise de lipoperoxidação apontou diferença ($P = 0,003$) entre os tratamentos, sendo que AN10 apresentou os menores ($P < 0,05$) níveis de TBARS em relação ao grupo CONT e AN100. O grupo AN50 também apresentou menores ($P < 0,05$) níveis de TBARS quando comparado ao grupo AN100, mas foi semelhante ($P > 0,05$) aos grupos CONT e AN10 (Figura 4). Quanto à morfologia espermática, não houve diferença entre as porcentagens de espermatozoides normais, ou com defeitos maiores ou menores (Tabela 5). O teste de capacitação também não apontou diferença na porcentagem de espermatozoides não capacitados ($P = 0,723$), capacitados ($P = 0,455$), ou reagidos ($P = 0,231$).

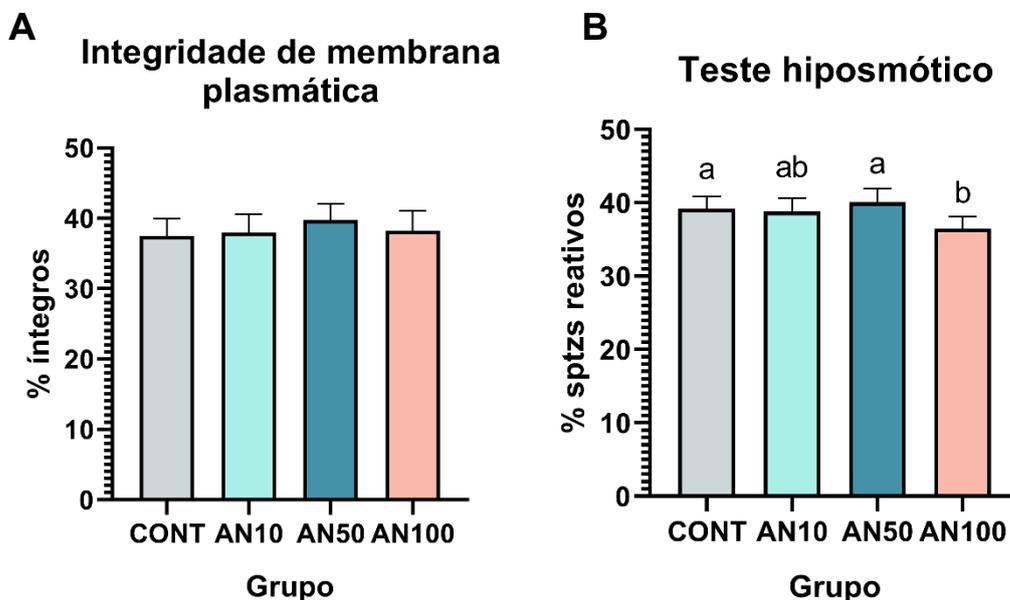


Figura 1: Gráfico de colunas representando (A) o número de espermatozoides (sptzs) com membrana íntegra e (B) o número de sptzs reativos ao teste hiposmótico (íntegros) em sêmen ovino descongelado. Meios tratados ou não com trans-anetol: não tratado – CONT; tratado com 10 μM - AN10; 50 μM – AN50; ou 100 μM – AN100. Dados apresentados como média \pm SEM. Letras diferentes diferem significativamente para cada parâmetro ($P < 0,05$).

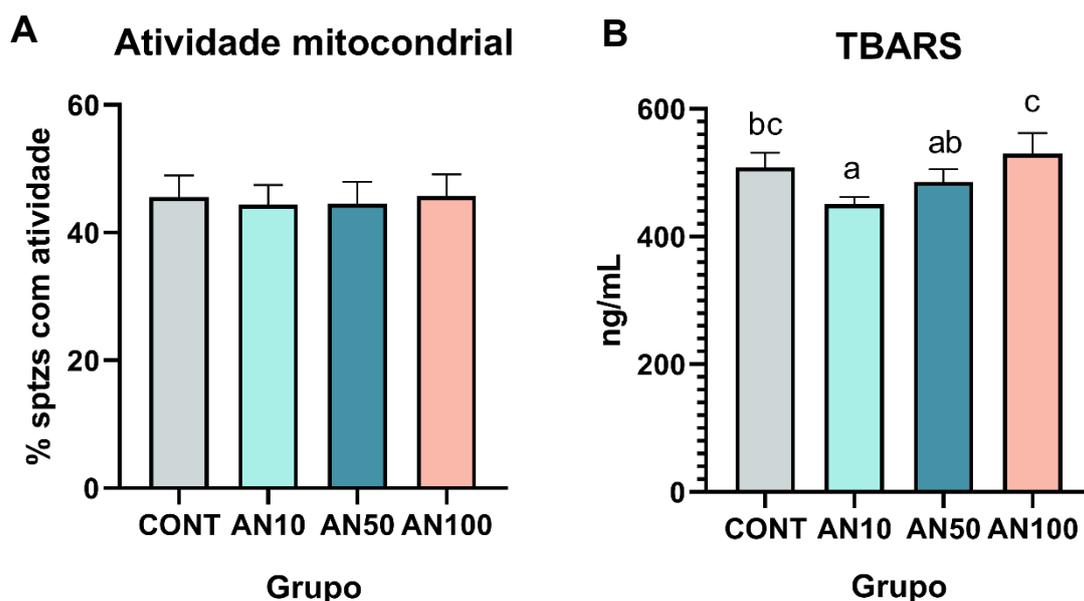


Figura 2. Gráfico de colunas representando, em sêmen ovino descongelado (**A**) a porcentagem de espermatozoides com atividade mitocondrial detectada, pela coloração com sonda MitoTracker, (**B**): a quantificação do teste de lipoperoxidação (resultados expressos em ng de Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) por mL). Meios tratados ou não com trans-anetol: não tratado – CONT; tratado com 10 μ M - AN10; 50 μ M – AN50; ou 100 μ M – AN100. Dados apresentados como média \pm SEM. Letras diferentes diferem significativamente para cada parâmetro ($P < 0,05$)

Tabela 5. Parâmetros (média \pm SEM) de morfologia espermática avaliados após descongelamento em sêmen ovino criopreservado com meio contendo ou não trans-anetol (AN) purificado.

Morfologia	Trans-anetol (μ M)				P
	0	10	50	100	
Patológicos					
Defeitos maiores (%)	2,1 \pm 1,6	2,6 \pm 1,6	2,3 \pm 1,3	2,0 \pm 1,7	0,990
Defeitos menores (%)	4,4 \pm 2,5	3,4 \pm 2,7	3,2 \pm 2,0	3,9 \pm 2,5	0,957
Morfologia normal (%)	93,3 \pm 3,3	94,0 \pm 3,3	94,4 \pm 2,3	94,3 \pm 3,0	0,970

Não houve diferença nos parâmetros para todos os tratamentos ($P > 0,05$)

Status acrossomal

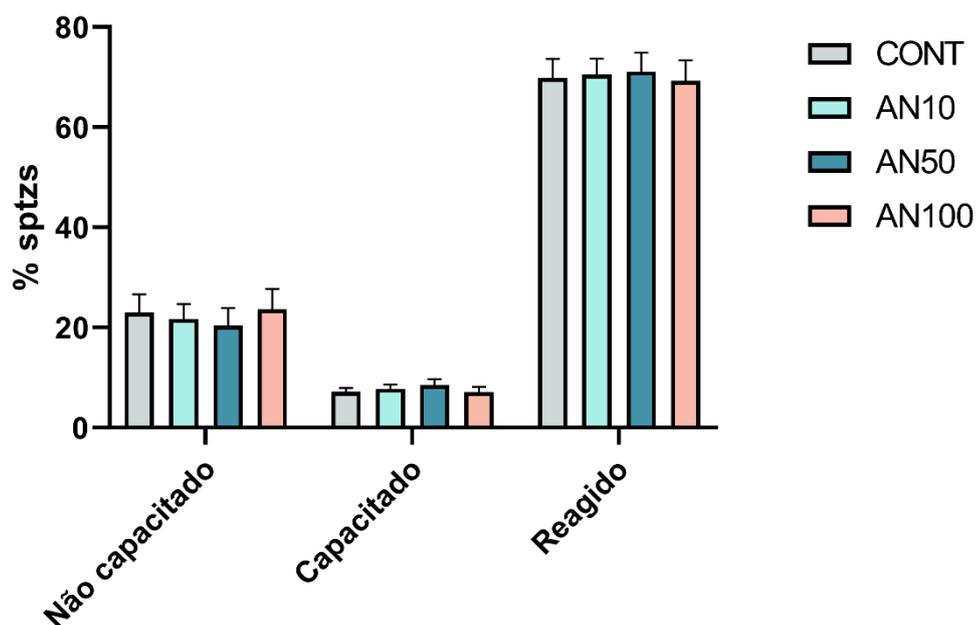


Figura 3: Gráfico de colunas representando a porcentagem de espermatozoides (sptzs) capacitados, não capacitados e reagidos. Meios tratados ou não com trans-anetol: não tratado – CONT; tratado com 10 μM - AN10; 50 μM – AN50; ou 100 μM – AN100. Dados apresentados como média \pm SEM. Não houve diferença nos parâmetros para todos os tratamentos ($P > 0,05$)

Na análise geral do teste de ligação à membrana perivitelínica detectou-se tendência entre os grupos ($P = 0,08$) que foi confirmada diante da comparação de contraste entre os tratamentos. Os grupos AN50 e AN100 apresentaram maior número de espermatozoides ligados à membrana em relação ao grupo controle ($P = 0,037$ e $P = 0,024$, respectivamente) (Figura 4).

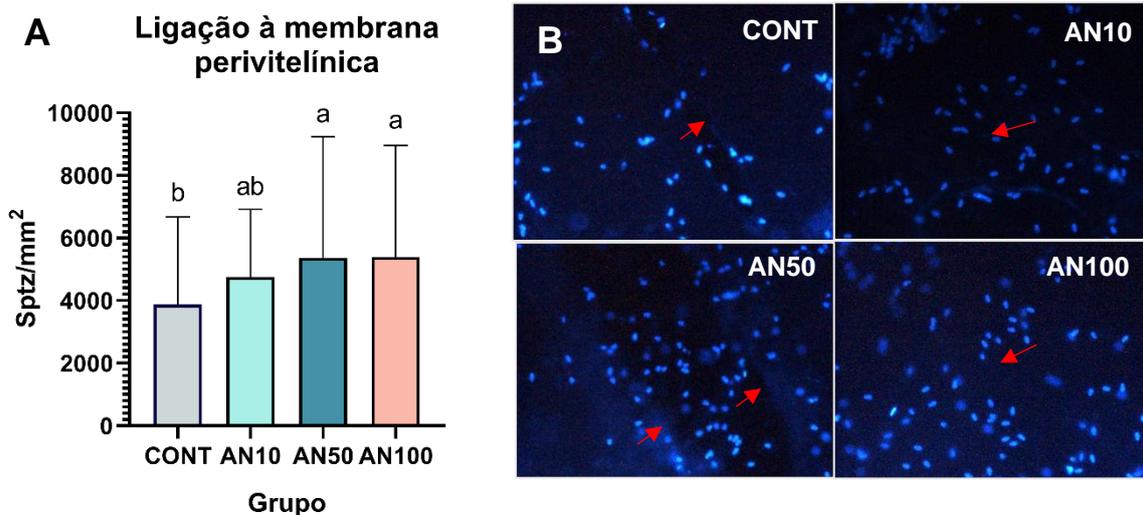


Figura 4: (A) Gráfico de colunas representando o número de espermatozoides (sptzs) ligados à membrana perivitelínica por mm². (B) Imagens representativas do teste de ligação à membrana perivitelínica. Sptzs corados por Hoechst, aumento de $\times 200$. Setas vermelhas indicam a membrana. Meios tratados ou não com trans-anetol: não tratado – CONT; tratado com 10 μM - AN10; 50 μM – AN50; ou 100 μM – AN100. Dados apresentados como média \pm SEM. Letras diferentes diferem significativamente para cada parâmetro ($P < 0,05$)

5. DISCUSSÃO

O estresse oxidativo é uma condição disruptiva que ocorre durante a criopreservação de espermatozoides, uma vez que o excesso de ROS decorrente desse processo leva a danos no DNA, mitocôndrias e membranas (PERIS-FRAU *et al.*, 2020). Devido à sua estrutura, o anetol é capaz de sequestrar H_2O_2 e, além disso, possui a capacidade de aumentar os níveis de catalase e superóxido dismutase (GALICKA *et al.*, 2014; CHOI E HWANG, 2004). Portanto, o AN pode reduzir o dano oxidativo causado às células espermáticas durante a criopreservação. Neste estudo observou-se proteção contra a lipoperoxidação nos grupos tratados com AN10, que apresentaram níveis de TBARS menores quando comparados ao CONT e AN100. Sendo assim, nesta menor concentração, o AN reduziu a lipoperoxidação em espermatozoides criopreservados, o que se justifica pela sua propriedade antioxidante. As células espermáticas têm maior suscetibilidade a sofrer peroxidação lipídica, pois possuem alta proporção de ácidos graxos poli-insaturados em suas membranas (MARTIN-HIDALGO *et al.*, 2019). Os produtos gerados pela peroxidação lipídica, como o malonaldeído, são reativos e oxidam mais intensamente estes ácidos graxos, bem como proteínas, levando à ruptura da fluidez da membrana e danos mitocondriais (AITKEN, 2017; MARTIN-HIDALGO *et al.*, 2019). Apesar da redução da peroxidação no grupo AN10, os resultados deste trabalho não indicaram melhoria ou piora, em relação ao grupo controle, nos demais parâmetros avaliados em decorrência da adição de 10 μM de AN no meio de criopreservação. Se faz necessário, portanto, investigar mais minuciosamente, se há alguma vantagem do uso de AN nesta concentração para a criopreservação do sêmen ovino, assim como sua associação com outros antioxidantes. A possível preservação da integridade do DNA, decorrente da menor oxidação celular, justificaria tal uso.

Os resultados de cinética espermática mostraram efeitos positivos da adição de 100 μM de AN ao meio de diluição do sêmen ovino (motilidade progressiva e espermatozoides com velocidade rápida e média), quando comparado ao grupo CONT. Além disso, a proporção de espermatozoides rápidos no grupo AN50 foi semelhante ao grupo AN100. A melhoria da cinética

espermática observada pode ser devido à atividade antioxidante do anetol, que resulta em menos ROS reagindo com estruturas espermáticas como as mitocôndrias e, como consequência, maior geração de energia para o movimento (AMARAL *et al.*, 2013; NAJAFI *et al.*, 2019). Uma outra hipótese para espermatozoides mais móveis pode ser a influência do anetol nas funções espermáticas, como a capacitação, resultando em hiperativação precoce. No entanto, em nosso estudo não houve diferença nas análises de capacitação, assim como não foram observados padrões de cinética espermática de hiperativação (VCL > 250,0 $\mu\text{m/s}$, VSL \leq 100,0 $\mu\text{m/s}$, LIN \leq 30% e ALH máximo \geq 9,0 μm ; MORTIMER E MAXWELL, 1999), resultado semelhante a outros autores (MALO *et al.*, 2011; LUO *et al.*, 2020; SOUSA *et al.*, 2021), o que indica que nas concentrações estudadas, o AN não promove capacitação precoce no espermatozoide ovino criopreservado.

O presente estudo também mostrou que o uso de AN em maior concentração (AN100) pode trazer desvantagens ao sêmen criopreservado, já que este grupo apresentou menor proporção de espermatozoides com membrana viável quando analisados no teste hiposmótico. Isso indica que a adição de altas concentrações de AN ao meio de criopreservação pode resultar em espermatozoides com membrana bioquimicamente instável quando desafiados em um ambiente com baixa osmolaridade. Foi demonstrado anteriormente que uma alta concentração de anetol pode afetar a estabilidade de biomembranas, resultando em alteração da morfologia das células, perda de ATP e morte celular (SHAROPOV *et al.*, 2017). Além disso, concentrações mais altas de anetol purificado podem levar ao aumento de patologias da peça intermediária e da cauda, resultando em maior número de espermatozoides com morfologia anormal (SOUSA *et al.*, 2021). Esse achado, somado com o resultado do teste hiposmótico deste presente trabalho, corroboram para a afirmação de que o anetol em concentrações mais elevadas possui influência negativa na membrana de espermatozoides. No entanto, os mecanismos exatos pelos quais o anetol atua na membrana espermática precisam ser melhor investigados. Em espermatozoides humanos, foi demonstrado que as concentrações de 10 e 100 μM de anetol reduzem o influxo de Ca^{2+} induzido pela progesterona, reduzindo a motilidade total e progressiva, e impedindo a

hiperativação e a capacidade de penetração dessas células (LUO *et al.*, 2020). Em outras células, o anetol também tem influência no influxo de Ca^{2+} , aumentando-o quando em baixas concentrações e reduzindo-o quando em altas concentrações (SOARES *et al.*, 2007). Isso pode indicar que o anetol tem diferentes ações dependendo da sua concentração, e nas células espermáticas isso pode afetar não apenas a motilidade, mas as características das membranas e a resistência ao estresse osmótico.

Ainda sobre o tratamento AN100, observou-se também que este grupo apresentou níveis mais elevados de TBARS, quando comparado a AN10. Esses níveis mais altos podem ser explicados pelo paradoxo antioxidante. Recentemente, o uso de antioxidantes, principalmente em concentrações elevadas, está sendo visto por outra perspectiva pelos pesquisadores. Tem sido observado que o uso de antioxidantes para neutralizar as ROS pode ter o resultado oposto, já que a perda do equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes pode levar a um estresse redutivo (TADROS E VIJ, 2019; SADEGHI *et al.*, 2022). De fato, o anetol, assim como alguns outros antioxidantes, têm atividade pró-oxidante em altas concentrações (SADEGHIPOUR *et al.*, 2005; SUCCU *et al.*, 2014; MORAIS *et al.*, 2019). Outra possível explicação para o aumento da peroxidação lipídica em AN100 também pode ser devido ao aumento dos parâmetros cinéticos observados nos espermatozoides deste grupo, indicando maior atividade e, conseqüentemente, maior produção de ROS (AMARAL *et al.*, 2013). No entanto, não se observou diferença na atividade mitocondrial entre todos os grupos, fato que desafia esta segunda via de justificativa.

Com relação ao teste de ligação à membrana perivitelínica, observou-se maior proporção de espermatozoides ligados à membrana à medida que se aumentou a concentração de AN no meio de criopreservação, sendo essa diferença detectada nos grupos AN50 e AN100. Esses resultados, somados à melhoria dos parâmetros de cinética, indicam um cenário de que o tratamento de espermatozoides com 50 ou 100 μ M de AN no meio de criopreservação pode ser uma vantagem, pois possibilitaria maior fertilidade do sêmen pós descongelamento. Tal hipótese ainda necessita de elucidação. No entanto, devido aos resultados desfavoráveis de AN100 nos testes hiposmótico e TBARS,

essa concentração aparenta ser prejudicial às células espermáticas ovinas e, portanto, deve evitar ser utilizada para este fim.

Os resultados de maior de velocidade e motilidade progressiva dos espermatozoides do grupo AN100 pós descongelamento, em comparação ao controle, corroboram aos encontrados em suínos (MALO *et al.*, 2011; MÓNTON *et al.*, 2015) e ovinos (NAJAFI *et al.*, 2019). Nesses estudos, os grupos tratados com extrato de erva-doce junto ao diluidor de sêmen apresentaram maior motilidade espermática após descongelamento, quando comparados ao grupo controle. Segundo Leal *et al.* (2013) a concentração de anetol em extratos de erva-doce varia de acordo com o método de extração, sendo de 1,1 a 6,8 mg/g de extrato. Nos estudos que utilizaram extratos de erva-doce para criopreservação de sêmen (MALO *et al.*, 2011; MÓNTON *et al.*, 2015; NAJAFI *et al.*, 2019) não se pode estipular qual a concentração de anetol presente nos extratos, uma vez que estes foram obtidos por métodos de infusão da planta. O uso de extratos vegetais para criopreservação de sêmen tem sido considerado uma fonte de antioxidantes natural e de baixo custo (ROS-SANTAELLA *et al.*, 2021). Estudos que utilizaram extrato de erva-doce para criopreservação de sêmen tiveram mais resultados positivos, como mais espermatozoides com integridade de membrana e sem diferença no teste hiposmótico (MALO *et al.*, 2011; MÓNTON *et al.*, 2015; NAJAFI *et al.*, 2019). Como o extrato obtido dessas plantas não contém apenas anetol em sua composição, conforme descrito anteriormente por Diao *et al.* (2014), há a hipótese de que os demais compostos das plantas podem atuar em sinergismo com o anetol. No entanto, a dificuldade em se trabalhar com os extratos é sua limitação na reprodutibilidade, já que há diferenças na quantidade de anetol obtida devido às partes da planta e métodos de extração utilizados (LEAL *et al.*, 2013; DIAO *et al.*, 2014). O anetol purificado, por outro lado, pode ser facilmente utilizado e leva a maior reprodutibilidade dos estudos, com alguns resultados positivos para criopreservação de sêmen ovino. No entanto, parece que é necessária maior investigação para definir se há uma concentração mais segura dessa substância, bem como outros efeitos nas células espermáticas.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este estudo é possível concluir que o uso de AN purificado no meio de criopreservação de sêmen ovino pode ser vantajoso, por aumentar a motilidade progressiva, reduzir a lipoperoxidação espermática e proporcionar maior número de espermatozoides aptos à ligação na membrana. Mais estudos se fazem necessários, mas concentrações de 10 e 50 μM de AN no meio diluidor parecem ser mais adequadas para criopreservação de sêmen ovino.

6.1 PERSPECTIVAS

Os próximos estudos com o uso de anetol purificado no meio de criopreservação de sêmen ovino deverão analisar o efeito da adição do anetol no DNA e em análises de ROS. Também é interessante investigar o efeito deste composto em diferentes tempos de incubação e na fertilização *in vitro* e *in vivo* na espécie ovina, assim como testar outras concentrações.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abril-Sánchez S, Crosignani N, Freitas-de-Melo A, Terrazas A, Damián JP, Beracochea F, Silveira P, Ungerfeld R. Sedation or anaesthesia decrease the stress response to electroejaculation and improve the quality of the collected semen in goat bucks. *Animal*. 2018; 12:12, p. 2598–2608.

Abril-Sánchez S, Freitas-de-Melo A, Giribonia J, Santiago-Morenoc J, Ungerfeld R. Sperm collection by electroejaculation in small ruminants: A review on welfare problems and alternative techniques. *Animal Reproduction Science*. 2019; 205:1–9.

Agarwal A, Cho CL, Sharma R. *Laboratory Evaluation of Reactive Oxygen Species*, em: M. K. Skinner (Ed.), *Encyclopedia of Reproduction* (Second Edition). Academic Press, 2018. p. 78–84.

Aitken RJ, Jones KT, Robertson SA. Reactive Oxygen Species and Review Sperm Function - In Sickness and In Health. *Journal of Andrology*. 2012; 33(6):1096-1106.

Aitken RJ. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Molecular Reproduction and Development*. 2017; 84:1039–1052.

Alfradique VAP, Batista RITP, Souza-Fabjan JMG, Côrtes LR, Bragança GM, Souza CV, Costa LC, Brandão FZ. Supplementation of 17 β -estradiol and progesterone in the co-culture medium of bovine oviductal epithelial cells and ovine spermatozoa reduces the sperm kinematics and capacitation. *Reproductive Biology*. 2018; 18:368–379.

Aljaser, FS. *Cryopreservation Methods and Frontiers in the Art of Freezing Life in Animal Models*, em: Y. Bozkurt, M. N. Bucak (Eds.), Animal Reproduction. IntechOpen, London, 2022. p. 1-25.

Amaral A, Lourenço B, Marques M, Ramalho-Santos J. Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction*. 2013; 146:(5)163–174.

Andrabi SMH, Maxwell WMC. Mitochondria functionality and sperm quality. *Animal Reproduction Science*. 2007; 99:(3-4)223–243.

Aprotosoiaie AC, Costache II, Miron A. *Anethole and Its Role in Chronic Diseases*, em: S. C. Gupta, S. Prasad, B. B. Aggarwal (Eds.), Drug Discovery from Mother Nature. Springer International Publishing Switzerland, 2016. p. 247-266.

Ax RL, Dally M, Didion BA, Lenz RW, Love CC, Varner DD, Hafez B, Bellin ME. *Semen Evaluation*, em: B. Hafez, E. S. E Hafez (Eds.), Reproduction in Farm Animals. Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 363–375.

Bailey JL, Bilodeau J, Cormier N. Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon. *Journal of Andrology*. 2000; 21:(1)1-7.

Baldi E, Tamburrino L, Muratori M, Degl'Innocenti S, Marchiani S. Adverse effects of in vitro manipulation of spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 2020; 220:106314.

Barbato GF, Cramer PG, Hammerstedt RH. A practical in vitro sperm-egg binding assay that detects subfertile males. *Biology of Reproduction*. 1998; 58(3):686–699.

Bausek N, Waclawek M, Schneider WJ, Wohlrab F. The Major Chicken Egg Envelope Protein ZP1 Is Different from ZPB and Is Synthesized in the Liver. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275:(15)28866–28872.

Bezerra FSB, Castelo TS, dos Santos EAA, Dantas TC, Simão BR, Silva AR. Assessment of the interaction between straw size and thawing rate and its impact on in vitro quality of post-thaw goat semen. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2012; 41:(3)592-597.

Bóveda P, Estes MC, Castaño C, Toledano-Díaz A., López-Sebastián A, Muñiz A, Prieto P, Mejía O, Ungerfeld R, Santiago-Moreno J. Slow and ultra-rapid freezing protocols for cryopreserving mouflon (*Ovis musimon*) and fallow deer (*Dama dama*) epididymal sperm. *Animal Reproduction Science*. 2018; 192:193-199.

Brito LFC, Althouse GC, Aurich C, Chenoweth PJ, Eilts BE, Love CC, Luvoni GC, Mitchell JR, Peter AT, Pugh DG, Waberski D. Andrology laboratory review: Evaluation of sperm concentration. *Theriogenology*. 2016; 85: 1507–1527.

Brito MM, Lúcio CF, Angrimani DSR, Losano JDA, Dalmazzo A, Nichi M, Vannucchi CI. Comparison of Cryopreservation Protocols (Single and Two-steps) and Thawing (Fast and Slow) for Canine Sperm. *Animal Biotechnology*. 2016; 28(1):67-73.

Broekhuijse MLWJ, Šoštarić E, Feitsmad H, Gadella BM. Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessments in pig artificial insemination. *Theriogenology*. 2011; 76:(8)1473-1486.

Campos LB, Peixoto GCX, Silva AM, Souza ALP, Castelo TS, Maia KM, Pereira AF, Silva AR. Estimating the binding ability of collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) sperm using heterologous substrates. *Theriogenology*. 2017; (92):57–62.

CBRA, *Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal*, 3 ed., Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2013.

Chenoweth PJ. Genetic sperm defects. *Theriogenology*. 2005; 64:(3) 457-468.

Choi EM, Hwang JK. Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of *Foeniculum vulgare*. *Fitoterapia*. 2004; 75:557– 565.

Cobb, M. An amazing 10 years: The discovery of egg and sperm in the 17th century. *Reproduction in Domestic Animals*. 2012; 47:(4)2-6.

Cormier N, Sirard MA, Bailey JL. Premature Capacitation of Bovine Spermatozoa is Initiated by Cryopreservation. *Journal of Andrology*. 1997; 18:4, p. 461-468.

Correia LFL, Espírito-Santo CG, Braga RF, Carvalho-de-Paula CJ, Silva AA, Brandao FZ, Freitas VJF, Ungerfeld R, Souza-Fabjanet JMG. Addition of antifreeze protein type I or III to extenders for ram sperm cryopreservation. *Cryobiology*. 2021; 98:194–200.

Davis BK. *Timing of fertilization in mammals: Sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1981; 78:(12II)7560-7564.

De Araujo GR, de Paula TAR, Deco-Souza T, Garay RM, Bergo CFL, Csermak-Júnior AC, da Silva LC, Alves SVP. Ocelot and oncilla spermatozoa can bind hen egg perivitelline membranes. *Animal Reproduction Science*. 2015; 163:56-62.

Del Olmo E, Bisbal A, Maroto-Morales A, García-Alvarez O, Ramon M., Jimenez-Rabadan P, Martínez-Pastor F, Soler AJ, Garde JJ, Fernandez-Santos MR. *Animal Reproduction Science*. 2013; 138:102–109.

Diao WR, Hu QP, Zhang H, Xu JG. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Food Control*. 2014; 35:109e116.

Domínguez-Rebolledo ÁE, Martínez-Pastor F, Fernández-Santos MR, del Olmo E, Bisbal A, Ros-Santaella JL, Garde JJ. Comparison of the TBARS assay and BODIPY C11 probes for assessing lipid peroxidation in red deer spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*. 2010; 45:e360–e368.

Drevet JR, Aitken RJ. Oxidation of Sperm Nucleus in Mammals: A Physiological Necessity to Some Extent with Adverse Impacts on Oocyte and Offspring. *Antioxidants*. 2020; 9(2):95.

Druart X, Cognié J, Baril G, Clément F, Dacheux JL, Gatti JL. In vivo imaging of in situ motility of fresh and liquid stored ram spermatozoa in the ewe genital tract. *Reproduction*. 2009; 138(1):45-53.

EMBRAPA, *Análise de conjuntura do mercado de caprinos e ovinos: sinais, tendências e desafios*. Boletim do Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos, Sobral, CE: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2018. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/190565/1/CNPC-2018-BCIM-n6.pdf>>. Acesso em: 29 de janeiro de 2022.

Erdmann RH, Blank MH, Ribeiro RN, Oliveira MJ, Cubas ZS, Pradiee J, Goularte KL, Moreira N. Cryopreservation of margay (*Leopardus wiedii*) spermatozoa: Effects of different extenders and frozen protocols. *Theriogenology*. 2020; 143:27-34.

FAO. *Meat and Meat Products*. Food Outlook, 2022. Disponível em: <https://www.fao.org/3/cb9427en/cb9427en_meat.pdf>. Acesso em: 21 de outubro de 2022.

FAOSTAT, 2022. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA>>, Acesso em: 23 de fevereiro de 2023.

Fatehi AN, Bevers MM, Schoevers E, Roelen BAJ, Colenbrander B, Gadella BM. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *Journal of Andrology*. 2006; 27:(2)176-188.

Fernández-Gonzalez R, Moreira PN, Pérez-Crespo M, Sánchez-Martín M, Ramirez MA, Pericuesta E, Bilbao A, Bermejo-Alvarez P, Hourcade JD, de Fonseca FR, Gutiérrez-Adán A. Long-Term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biology of Reproduction*. 2008; 78:761-772.

Fickel J, Wagener A, Ludwig A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. *European Journal of Wildlife Research*. 2007; 53:(2)81-89.

Figueiroa RJ, Koch TG, Betts DH. *Stem Cells and Animal Therapies*, em: M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*. Academic Press, 2011. p. 417-427.

Florman HM, Jungnickel MK, Sutton KA. Regulating the acrosome reaction. *International Journal of Developmental Biology*. 2008; 52:(5-6)503-510.

Folgerø T, Bertheussen K, Lindal S, Torbergesen T, Øian P. Mitochondrial disease and reduced sperm motility. *Human Reproduction*. 1993; 8:(11)1863-1868.

Fonseca JF, Souza-Fabjan JG, Oliveira MEF, Leite CR, Nascimento-Penido PMP, Brandão FZ., Lehloenya KC. Nonsurgical embryo recovery and transfer in sheep and goats. *Theriogenology*. 2016; 86:144-151.

Foote RH. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *Journal of Animal Science*. 2002; 80:1-10.

Galicka A, Krętowski R, Nazaruk J, Cechowska-Pasko M. Anethole prevents hydrogen peroxide-induced apoptosis and collagen metabolism alterations in human skin fibroblasts. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2014; 394:217-224.

Gibb Z, Griffin RA, Aitken RJ, Iulius GN. Functions and effects of reactive oxygen species in male fertility. *Animal Reproduction Science*. 2020; 220:106456.

Gibbons AE, Fernandez J, Bruno-Galarraga MM, Spinelli MV, Cueto MI. Technical recommendations for artificial insemination in sheep. *Animal Reproduction*. 2019; 16(4):803-809.

Greyling C, Grobbelaar N. Seasonal variation in semen quality of Boer and Angora goat rams using different collection techniques. *South African Journal of Animal Science*. 1983; 13:(4)250-252.

Hassan HA, Domain G, Luvoni GC, Chaaya R, Soom AV, Wydooghe E. Canine and Feline Epididymal Semen - A Plentiful Source of Gametes. *Animals*. 2021; 11:2961.

Hassanzadeh SA, Abbasi-Maleki S, Mousavi Z. Anti-depressive-like effect of monoterpene trans-anethole via monoaminergic pathways. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2022; 29:3255–3261.

Henkel RR, Schill WB. Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2003; 1:108.

Hezavehei M, Sharafi M, Kouchesfahani HM, Henkel R, Agarwal A, Esmaeili V, Shahverdi A. Sperm cryopreservation: A review on current molecular

cryobiology and advanced approaches. *Reproductive BioMedicine Online*. 2018; 37:(3)327-339.

Hidalgo MMT, Almeida ABM, Moraes FLZ, Marubayashi RYP, Souza FF, Barreiros TRR, Martins MIM. Sperm subpopulations influence the pregnancy rates in cattle. *Reproduction in Domestic Animals*. 2021; 56:(8)1117-1127.

Holt W. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology*. 2000; 53:(1)47-58.

Isachenko V, Isachenko E, Katkov II, Montag M, Dessole S, Nawroth F, Van Der Ven H. Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: Effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability. *Biology of Reproduction*. 2004; 71:(4)1167-1173.

Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1984; 70:219-228.

Jha PK, Alama MGS, Mansura AAL, Nahera N, Islamc T, Bhuiyana MU, Bari FY. Cryopreservation of Bangladeshi ram semen using different diluents and manual freezing techniques. *Cryobiology*. 2019; 89:35–41.

Jiménez-Rabadán P, Ramón M, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, del Olmo E, Pérez-Guzmán MD, Bisbal A, Fernández-Santos MR, Garde JJ, Soler AJ. Effect of semen collection method (artificial vagina vs. electroejaculation), extender and centrifugation on post-thaw sperm quality of Blanca-Celtibérica buck ejaculates. *Animal Reproduction Science*. 2012; 132:88-95.

Kang P, Kim KY, Lee HS, Min SS, Seol GH. Anti-inflammatory effects of anethole in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Life Sciences*. 2013; 93:955–961.

Kodama H, Kuribayashi Y, Gagnon C. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. *Journal of Andrology*. 1996; 17:(2)151-157.

Kothari S, Thompson A, Agarwal A, du Plessis SS. Free radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2010; 48:(5)425-435.

Kumar A, Prasad JK, Srivastava N, Ghosh SK. Strategies to Minimize Various Stress-Related Freeze-Thaw Damages during Conventional

Cryopreservation of Mammalian Spermatozoa. *Biopreservation and Biobanking*. 2019; 17:(6)603-612.

Larsen JWA. *Ram Reproductive Management*. MSD Manual: Veterinary Manual. Disponível em: <<https://www.msdsvetmanual.com/management-and-nutrition/management-of-reproduction-sheep/ram-reproductive-management>>. Acesso em: 21 de outubro de 2022.

Layek SS, Mohanty TK, Kumaresan A, Parks JE. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal Reproduction Science*. 2016; 172:1-9.

Leal PF, Almeida TS, Prado GHC, Prado JM, Meireles MAA. Extraction Kinetics and Anethole Content of Fennel (*Foeniculum vulgare*) and Anise Seed (*Pimpinella anisum*) Extracts Obtained by Soxhlet, Ultrasound, Percolation, Centrifugation, and Steam Distillation. *Separation Science and Technology*. 2013; 46:(11)1848-1856.

Ledesma A, Manes J, Cesari A, Alberio R, Hozbor F. Electroejaculation increases low molecular weight proteins in seminal plasma modifying sperm quality in *Corriedale* rams. *Reproduction in Domestic Animals*. 2014; 49:324–332.

Lonergan P. Review: Historical and futuristic developments in bovine semen technology. *Animal*. 2018; 12:(S1)s4-s18.

Luo T, Wang F, Wenga S, Chen H, Kang H, Wanga J, Luo S. Anethole compromises human sperm function by affecting the sperm intracellular calcium concentration and tyrosine phosphorylation. *Reproductive Toxicology*. 2020; 93:99–105.

Lv C, Wu G, Hong Q, Quan G. Spermatozoa Cryopreservation: State of Art and Future in Small Ruminants. *Biopreservation and Biobanking*. 2019; 17:2.

Malo C, Gil L, Cano R, González N, Luño V. Fennel (*Foeniculum vulgare*) provides antioxidante protection for boar semen cryopreservation. *Andrologia*. 2011; 44:710–715.

Marinov V, Valcheva-Kuzmanova S. Review on the Pharmacological Activities of Anethole. *Scripta Scientifica Pharmaceutica*. 2015; 2(2):14-19.

Marques-Santos LF, Oliveira JGP, Maia RC, Rumjanek VM. Mitotracker Green is a P-Glycoprotein Substrate. *Bioscience Reports*. 2003; 23:4, p. 199-212.

Martin-Hidalgo D, Bragado MJ, Batista AR, Oliveira PF, Alves MG. Antioxidants and Male Fertility: From Molecular Studies to Clinical Evidence. *Antioxidants*. 2019; 8:(89).

Montón A, Gil L, Malo C, Olaciregui M, González N, Blas I. Sage (*Salvia Officinalis*) and Fennel (*Foeniculum Vulgare*) Improve Cryopreserved Boar Epididymal Semen Quality Study. *CryoLetters*. 2015; 36(2):83-90.

Moore AI, Squires EL, Graham JK. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*. 2005; 51:(3)241-249.

Morais MLGS, Brito DCC, Pinto Y, Silva LM, Vizcarra DM, Silva RF, Cibin FWS, Campello CC, Alves BG, Araújo VR, Pinto FC, Pessoa ODL, Figueiredo JR, Rodrigues APR. Natural antioxidants in the vitrification solution improve the ovine ovarian tissue preservation. *Reproductive Biology*. 2019; 19:270-278.

Morris ST. Economics of sheep production. *Small Ruminant Research*. 2009; 86:59-62.

Mortimer ST, Maxwell WMC. Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. *Reproduction, Fertility and Development*. 1999; 11:25–30.

Mortimer ST, Swan MA. Variable kinematics of capacitating human spermatozoa. *Human Reproduction*. 1995; 10:(12)3178-3182.

Najafi A, Kia HD, Mehdipoura M, Shamsollahia M, Miller DJ. Does fennel extract ameliorate oxidative stress frozen-thawed ram sperm? *Cryobiology*. 2019; 87:47–51.

Noakes DE, Parkinson TJ, England GCW. *Normal reproduction in male animals*, em: D. E. Noakes, T. J. Parkinson, G. C. W. England (Eds.), *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics* (Eighth edition). Saunders, 2001. p. 673-694.

Olivares CCS. *Avaliação de diferentes métodos de seleção de espermatozoides ovinos e do status da capacitação espermática em sêmen criopreservado de ruminantes*. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária - Clínica e Reprodução Animal. Faculdade de Veterinária. 2017. p. 145.

Ombelet W, Van Robays J. Artificial insemination history: hurdles and milestones. *Facts Views Vis Obgyn*. 2015; 7:(2)137-143.

Onofre J, Baert Y, Faes K, Goossens E. Cryopreservation of testicular tissue or testicular cell suspensions: A pivotal step in fertility preservation. *Human Reproduction Update*. 2016; 22:(6)744-761.

Paramio MT, Izquierdo D. Current status of in vitro embryo production in sheep and goats. *Reproduction in Domestic Animals*. *Reproduction in Domestic Animals*. 2014; 49:(4)37-48.

Pau S, Falchi L, Ledda M, Pivato I, Valentino M, Bogliolo L, Ariu F, Zedda MT. Reproductive Performance Following Transcervical Insemination with Frozen Thawed Semen in Ewes Submitted to Surgical Incision of Cervical Folds (SICF): Comparison with Laparoscopic Artificial Insemination. *Animals*. 2020; 10:108.

Peris-Frau P, Soler AJ, Iniest-Cuerda M, Martín-Maestro A, Sánchez-Ajofrín I, Medina-Chávez DA, Fernández-Santos MR, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Montoro V, Julián Garde J. Sperm cryodamage in ruminants: understanding the molecular changes induced by the cryopreservation process to optimize sperm quality. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21:(8)2781.

Pezo F, Yeste M, Zambrano F, Uribe P, Risopatrón J, Sánchez R. Antioxidants and their effect on the oxidative/nitrosative stress of frozen-thawed boar sperm. *Cryobiology*. 2021; 98:5–11.

Pinnapureddy AR, Stayner C, McEwan J, Baddeley O, Forman J and Eccles MR. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2015; 10:107.

Ramu S, Jeyendran RS. *The Hypo-osmotic Swelling Test for Evaluation of Sperm Membrane Integrity*, em: D. T. Carrell, K. I. Aston, *Spermatogenesis: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology. Humana Press, 2013. p. 21-25.

Rickard JP, Schmidt RE, Maddison JW, Bathgate R, Lynch GW, Druart X, De Graaf SP. Variation in seminal plasma alters the ability of ram spermatozoa to survive cryopreservation. *Reproduction, Fertility and Development*. 2016; 28:(4)516-523.

Riesco MF, Alvarez M, Anel-Lopez L, Neila-Montero M, Palacin-Martinez C, Montes-Garrido R, Boixo JC, Paz P, Anel L. Multiparametric Study of Antioxidant Effect on Ram Sperm Cryopreservation - From Field Trials to Research Bench. *Animals*. 2021; 11:283.

Robertson L, Wishart GJ, Horrocks AJ. Identification of perivitelline N-linked glycans as mediators of sperm-egg interaction in chickens. *Journal of Reproduction and Fertility*. 2000; 120:397-403.

Rodriguez-Wallberg KA, Waterstone M, Anastácio A. Ice age: cryopreservation in assisted reproduction – an update. *Reproductive Biology*. 2019; 19:(2)119-126.

Ros-Santaella JL, Pintus E. Plant Extracts as Alternative Additives for Sperm Preservation. *Antioxidants*. 2021; 10:772.

Rostami B, Ebrahimi D, Sadeghipanah H, Masoumi R, Shahir MH. Effects of supplementation of tris-egg yolk extender with different sugars and antioxidants on freezability of ram semen. *Cryobiology*. 2020; 92:62–66.

Rui BR, Angrimani DSR, Bicudo LC, Losano JDA, Nichi M, Pereira RJG. A fast, low-cost and efficient method for the diagnosis of sperm DNA fragmentation in several species. *Reproduction in Domestic Animals*. 2017; 53(1):171-175.

Sadeghi N, Boissonneault G, Tavalae M, Nasr-Esfahani MH. Oxidative versus reductive stress: a delicate balance for sperm integrity. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2022; 69(1):20-31.

Sadeghipour M, Terreux R, Phipps J. Flavonoids and tyrosine nitration: structure–activity relationship correlation with enthalpy of formation. *Toxicology in Vitro*. 2005; 19:155-165.

Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*. 2000; 62:77-111.

Santos IW, Nóbrega Jr JE, Ilha GF, Rovani MT, De Cesaro MP, Gasperin BG, Gonçalves PBD. Technique to simultaneously evaluate ram sperm morphology, acrosome and membrane integrity. *Animal Reproduction*. 2015; 12(4):884-889.

Sarlós P, Molnár A., Kókai M, Gábor GY, Rátky J. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Veterinaria Hungarica*. 2002; 50(2):235–245.

Sharafi M, Blondin P, Vincent P, Anzar M, Benson JD. Hydroxytyrosol and resveratrol improves kinetic and flow cytometric parameters of cryopreserved bull semen with low cryotolerance. *Animal Reproduction Science*. 2022; 245:107065.

Sharopov F, Valiev A, Satyal P, Gulmurodov I, Yusufi S, Setzer WN, Wink M. Cytotoxicity of the Essential Oil of Fennel (*Foeniculum vulgare*) from Tajikistan. *Foods*. 2017; 6:(73).

Sherman JK. Low temperature research on spermatozoa and eggs. *Cryobiology*. 1964; 1:(2)103-129.

Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal Reproduction Science*. 2016; 169:2-5.

Soares PMG, Lima RF, Pires AF, Souza EP, Assreuy AMS, Criddle DN. Effects of anethole and structural analogues on the contractility of rat isolated aorta: Involvement of voltage-dependent Ca²⁺-channels. *Life Sciences*. 2007; 81:1085–1093.

Sousa MS, Brito BF, Novaes MAS, Câmara TS, Paula NRO, Salgueiro CCM, Nunes JF. Effect of adding anethole to the cryopreservation medium (powdered coconut water) on morphology, kinetics, and oxidative stress of buck sperm. *Semina: Ciências Agrárias*. 2021; 42(6):3235-3246.

Souza CV, Brandão FZ, Santos JDR, Alfradique VAP, Santos VMB, Morais MCC, Rangel PSC, Silva AA, Souza-Fabjan JMG. Effect of different concentrations of L-carnitine in extender for semen cryopreservation in sheep. *Cryobiology*. 2019; 89:104–108.

Stival C, Molina LCP, Paudel B, Buffone MG, Visconti PE, Krapf D. *Sperm Capacitation and Acrosome Reaction in Mammalian Sperm*, em: M.G. Buffone (Ed.), *Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization*. Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology. Springer International Publishing Switzerland, 2016; p. 95-106.

Succu S, Pasciu V, Manca ME, Chelucci S, Torres-Rovira L, Leoni GG, Zinellu A, Carru C, Naitana S, Berlinguer F. Dose-dependent effect of melatonin

on postwarming development of vitrified ovine embryos. *Theriogenology*. 2014; 81:1058-1066.

Suriyasomboon A, Lundeheim N, Kunavongkrit A, Einarsson S. Effect of temperature and humidity on sperm production in Duroc boars under different housing systems in Thailand. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 2005; 67:(8)777-785.

Tadros NN, Vij SC. *The Oxidant Paradox*, em: R. Henkel, L. Samanta, A. Agarwal (Eds.), Oxidants, Antioxidants, and Impact of the Oxidative Status in Male Reproduction. Academic Press, 2019. p. 9-15.

Tsakmakidis IA. Ram semen evaluation: Development and efficiency of modern techniques. *Small Ruminant Research*. 2010; 92:126–130.

Ugur MR, Abdelrahman AS, Evans HC, Gilmore AA, Hitit M, Arifiantini RI, Purwantara B, Kaya A, Memili E. Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. *Frontiers in Veterinary Science*. 2019; 6:268.

Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 2002; 57:149-179.

Villaverde AISB, Fioratti EG, Penitenti M, Ikoma MRV, Tsunemi MH, Papa FO, Lopes MD. Cryoprotective effect of different glycerol concentrations on domestic cat spermatozoa. *Theriogenology*. 2013; 80:730-737.

Vozaf J, Svoradová A, Baláži A, Vašíček J, Olexiková L, Dujíčková L, Makarevich AV, Jurčík R, Ďúranová H, Chrenek P. The Cryopreserved Sperm Traits of Various Ram Breeds: Towards Biodiversity Conservation. *Animals*. 2022; 12:1311.

Waclawek M, Foisner R, Nimpf J, Schneider WJ. The chicken homologue of zona pellucida protein-3 is synthesized by granulosa cells. *Biology of Reproduction*. 1998; 59:1230-1239.

Ward CR, Storey BT. Determination of the Time Course of Capacitation in Mouse Spermatozoa Using a Chlorotetracycline Fluorescence Assay. *Developmental Biology*. 1984; 104:287-296.

WHO. *Laboratory manual for the examination and processing of human semen*, 6 ed. Geneva, World Health Organization, 2021.

Wulster-Radcliffe MC, Williams MA, Stellflug JN, Lewis GS. Technical note: Artificial vagina vs a vaginal collection vial for collecting semen from rams. *Journal of Animal Science*. 2001; 79:2964–2967.

Xiao W, Loscalzo J. Metabolic Responses to Reductive Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2020; 32(18):1347.

Yang SX, Adams GP, Zwiefelhofer EM, Rajapaksha K, Anzar M. Cholesterol-cyclodextrin complex as a replacement for egg yolk in bull semen extender: sperm characteristics post-thawing and in vivo fertility. *Animal Reproduction Science*. 2021; 225:106691.

Yániz JL, Palacín I, Vicente-Fiel S, Gosalvez J, López-Fernández C, Santolaria P. Comparison of Membrane-Permeant Fluorescent Probes for Sperm Viability Assessment in the Ram. *Reproduction in Domestic Animals*. 2013; 48:598–603.

Zambelli D, Prati F, Cunto M, Iacono E, Merlo B. Quality and in vitro fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration. *Theriogenology*. 2008; 69:(4)485-490.

8. APÊNDICES E ANEXOS

8.1 ANEXO I - FOLHA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade
Federal
Fluminense



Universidade Federal Fluminense
Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da adição de trans-anetol na criopreservação de sêmen ovino", protocolada sob o CEUA nº 3538120222 (ID 001423), sob a responsabilidade de **Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan e equipe; Rachel Ferreira Braga; LUCAS FRANCISCO LEODIDO CORREIA** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Fluminense (CEUA/UFF) na reunião de 26/05/2022.

We certify that the proposal "Effect of trans-anethole addition on the cryopreservation of sheep semen ", utilizing 14 Ovines (14 males), protocol number CEUA 3538120222 (ID 001423), under the responsibility of **Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan and team; Rachel Ferreira Braga; LUCAS FRANCISCO LEODIDO CORREIA** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University Fluminense (CEUA/UFF) in the meeting of 05/26/2022.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 04/2022 a 04/2024 Área: Medicina Veterinária

Origem: Unidade Experimental em Caprinos e Ovinos - UNIPECO

Espécie: Ovinos

sexo: Machos

idade: 1 a 6 anos

Quantidade: 14

Linhagem: Santa Inês

Peso: 45 a 100 kg

Niterói, 29 de outubro de 2022

Carla Eponina P. Pinto

Profª Carla Eponina

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Fluminense

Caroline de Souza Barros

Profª Caroline de Souza Barros

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Fluminense



8.2 ANEXO II – RESUMO APRESENTADO NA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES (SBTE) 2022

Abstracts - 35th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE)

Male reproductive physiology and sperm technology

A preliminary analysis of commercial trans-anethole effects during ram semen cryopreservation

Rachel Ferreira Braga¹, Nathalia Oliveira Barbosa¹, Lucas Francisco Leodido Correia¹, Mariana Pedrosa de Paula Guimaraes¹, Erlandia Marcia Vasconcelos¹, Thais Gomes de Oliveira¹, Caio Cezar de Carvalho Cunha¹, Bruna Rios Coelho Alves¹, Felipe Zandonadi Brandão¹, Joanna Maria Gonçalves Souza-Fabjan¹

¹ UFF - Universidade Federal Fluminense (Av. Alm. Ary Parreiras, 507 - Icaraí, Niterói - RJ)

Resumo

Cryopreserved semen is used in artificial insemination, positively impacting the genetic improvement of many species. Oxidative stress, a major event caused by cryopreservation, can cause cellular damage and reduce sperm viability. Trans-anethole, a natural antioxidant found in plants (e.g. fennel), appears to improve sperm cell survival during semen cryopreservation. This study assessed the effects of different concentrations of trans-anethole (117870, Sigma) added to sheep semen extender on post cryopreservation survival, kinetic parameters, and sperm binding to egg perivitelline membrane. Semen was collected from six rams using an artificial vagina, on five different days. Ejaculates with sperm motility >70% were used (n=22) and diluted individually with Tris-Egg Yolk-Glycerol extender, with trans-anethole, according to the treatment: CONT (control group, 0 µM), AN10 (10 µM), AN50 (50 µM) and AN100 (100 µM), with a final concentration of 400 x 10⁶ spermatozoa/mL. Cryopreservation was carried out using a freezing machine. A cooling rate of 0.25 °C/min was applied until 5 °C, and this temperature was maintained for 4 h. The freezing rate used was -20 °C/min from 5 to -120 °C, when the straws were immersed in liquid nitrogen (-196 °C) and stored. Thawing was performed at 37 °C for 30 s. Samples were evaluated regarding sperm kinetics (by objective Computer Assisted Semen Analysis, CASA), plasma membrane integrity (PMI, staining with acridine orange and propidium iodide), and functionality (PMF, hypoosmotic swelling test) as well as the sperm binding to egg perivitelline membrane test. Data were analyzed using a generalized linear mixed model, and the results are presented as mean ± SEM. After thawing, the progressive motility of AN100 was higher (P<0.05) than AN50 (13.8 ± 1.8 vs 10.2 ± 1.8%), and both were similar (P>0.05) to CONT (11.5 ± 1.8%). The medium velocity of AN100 (11.3 ± 1.4%) was higher (P<0.05) than AN50 (8.5 ± 1.4%) and CONT (8.1 ± 1.4%). Differences (P<0.05) were also observed in average path velocity between AN100 (33.6 ± 2.6 µm/s) and AN50 (29.5 ± 2.6 µm/s), both being similar to CONT (32.1 ± 2.7 µm/s); and straight-line velocity between AN100 (24.0 ± 2.0 µm/s) and AN50 (20.7 ± 2.0 µm/s), with CONT presenting an intermediary value (23.3 ± 2.1 µm/s). The number of sperm bound to the egg perivitelline membrane was higher (P=0.05) between AN100 and CONT groups (4293.0 ± 483.9 vs 3076.2 ± 483.9 sperm/mm², respectively). There was no difference (P>0.05) among groups regarding other kinetics parameters, PMI and PMF. In conclusion, the addition of 100 µM trans-anethole to cryopreservation media leads to an improvement in sperm kinetics as well as its fertilizing capacity assessed by the binding test, without disrupting their membrane integrity and functionality.

Keywords: sperm, antioxidant, freezing, fennel

Acknowledgments

FAPERJ and CAPES.