



## Relação entre a capacitação espermática e a fertilidade de sêmen criopreservado de bovinos

*Relationship between sperm capacitation and fertility in bovine cryopreserved semen*

Eneiva Carla Carvalho Celeghini<sup>1\*</sup>, Laura Nataly Garcia-Oliveros<sup>1</sup>, Rubens Paes de Arruda<sup>2</sup>, Alexandre da Rocha Bozzi<sup>1</sup>, Gabriel de Miranda Teodoro Soares<sup>1</sup>, Marina Port Lamellas<sup>1</sup>, Thais de Oliveira Cardoso Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução Animal, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil

### Resumo

A qualidade do sêmen criopreservado, utilizado na inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em bovinos, é um dos principais fatores que impactam sobre a fertilidade, e está relacionada à capacidade de produção espermática dos touros, à criotolerância dos espermatozoides e aos critérios técnicos do processo de criopreservação adotados. Neste sentido, devemos destacar a importância do controle de qualidade das partidas de sêmen antes de serem liberadas para uso na IATF. Nos últimos anos várias técnicas vêm sendo desenvolvidas para avaliar com mais acurácia as partidas de sêmen e evitar o uso daquelas que possam resultar em prejuízos na fertilidade, mas mesmo assim, tem se notado alta variabilidade na taxa de prenhez entre touros e entre partidas de sêmen. Esta divergência se deve ao fato da habilidade fértil do espermatozoide ser multifatorial, ou seja, dependente de diversas características estruturais, morfofuncionais e moleculares. Ademais, os eventos que permitem os espermatozoides passarem por capacitação espermática, um pré-requisito para a fertilidade, têm intrigado os pesquisadores em vista da complexidade dos processos envolvidos e dos efeitos deletérios da criopreservação espermática. Esta revisão tem por objetivo compilar estudos que mostrem a relação entre a capacitação espermática e a fertilidade do sêmen bovino criopreservado, levando em consideração as técnicas de avaliação e os resultados até o momento.

**Palavras-chave:** Touros, Espermatozoides, Criopreservação, IATF, Taxa de Prenhez

### Abstract

*The quality of cryopreserved semen, used in fixed-time artificial insemination (FTAI) in cattle, is one of the main factors that impact fertility and is related to the sperm production capacity of bulls, sperm cryotolerance, and the technical criteria for cryopreservation. In this sense, we must highlight the importance of quality control of semen batches before commercialization for the FTAI. In recent years, several techniques have progressed to more accurately evaluate semen batches and avoid using those that may result in impaired fertility. However, we still notice a high variability in the pregnancy rate between bulls and between semen batches. This divergence is due to the multifactorial sperm-fertilizing ability, i.e., it depends on several structural, morphofunctional, and molecular characteristics. In addition, the events that allow sperm to undergo sperm capacitation, a prerequisite for fertility, have intrigued researchers due to the complexity of the processes involved and the adverse effects of sperm cryopreservation. This review aims to compile studies that show the relationship between sperm capacitation and fertility in cryopreserved bovine semen, considering the evaluation techniques and results to date.*

**Keywords:** Bulls, Spermatozoa, Cryopreservation, FTAI, Pregnancy Rate

### Introdução

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, mas ocupa a segunda colocação na produção de carne bovina (ABIEC, 2022), fato que evidencia a margem para a expansão da produtividade do rebanho. Essa expansão pode ser alcançada por associar o melhoramento genético com o aumento da



fertilidade do rebanho, ambos podem ser obtidos pela aplicação de biotécnicas reprodutivas. Segundo a Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA, 2021), o país apresentou nos últimos anos um aumento expressivo na aplicação da inseminação artificial (IA) em bovinos, evidenciado pelo aumento na comercialização de doses de sêmen criopreservado, principalmente das raças de corte (ASBIA, 2021). Merece destaque o fato de que, no último ano, 93,3% das inseminações realizadas em território nacional fizeram uso da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e geraram taxas médias de prenhez em torno de 52% com o emprego do sêmen criopreservado (Baruselli *et al.*, 2022). Estes resultados são influenciados por diversos fatores, que podem ser agrupados naqueles inerentes à fêmea, à técnica e ao sêmen. Entre os fatores inerentes ao sêmen, podemos afirmar que a qualidade do sêmen criopreservado utilizado na IATF possui alto impacto sobre a fertilidade (Celeghini *et al.*, 2017) e está diretamente relacionada à capacidade dos touros em produzirem espermatozoides “saudáveis” e resistentes aos processos de refrigeração, congelamento e descongelamento, bem como aos critérios técnicos de criopreservação.

Há alguns anos já se sabe que as características das partidas de sêmen criopreservado bovino, como motilidade, vigor, número de espermatozoides por palheta e morfologia espermiática servem como critério inicial para a liberação antes da comercialização e uso na IA (CBRA, 2013), sendo seguidos por alguns laboratórios comerciais como controle de qualidade, mas que estas características nem sempre são suficientes para identificar todas as partidas de sêmen com baixo potencial de fertilidade, o que fica evidenciado na alta variabilidade da taxa de prenhez entre touros e entre partidas de sêmen (Oliveira *et al.*, 2014; Celeghini *et al.*, 2017; Longobardi *et al.*, 2020). Em vista disso, as centrais de coleta e processamento de sêmen (CCPS) têm classificado os touros como de alta, intermediária e baixa fertilidade, de acordo com os resultados após IATF, compilados numa ampla base de dados. Somente a partir daí, podem ser tomadas decisões de excluir os touros de baixa fertilidade do catálogo. Esta divergência nos resultados se deve ao fato de que a habilidade fértil do espermatozoide é multifatorial, ou seja, depende de diversas características estruturais e morfofuncionais, além da motilidade e morfologia espermiática, também integridade e funcionalidade das membranas e do DNA, equilíbrio dos fatores antioxidante/pró-oxidante, habilidade em passar pelo processo de capacitação espermiática, além das características intrínsecas, nas quais são considerados conteúdos moleculares e de organelas do espermatozoide, tais como proteínas, RNAs e centríolos (Oliveira *et al.*, 2014; Santos, 2016; Celeghini *et al.*, 2017; Alves *et al.*, 2020), as quais nem sempre são incluídas nas análises das partidas de sêmen antes do uso na IA.

Para se evitar prejuízos aos produtores e às CCPS, várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas nos últimos anos com o objetivo de buscar técnicas acuradas para prever o potencial de fertilidade de partidas de sêmen antes de serem utilizadas na IA (Celeghini *et al.*, 2007; Gillan *et al.*, 2008; Arruda *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2014; Santos, 2016; Alves *et al.*, 2019; Okano *et al.*, 2019; Celeghini *et al.*, 2019; Alves *et al.*, 2020; Uehara Berton *et al.*, 2022). Muitas destas técnicas tem apresentado resultados promissores no diagnóstico de alterações que refletem no potencial de fertilidade, mas devido ao caráter multifatorial da célula espermiática, nem sempre esse diagnóstico é fácil, podendo culminar com falhas algumas vezes (Santos, 2016; Okano *et al.*, 2019; Alves *et al.*, 2020; Uehara Berton *et al.*, 2022), o que justifica a busca intensa e contínua por mais ferramentas com maior poder preditor e que seja de aplicação prática na rotina laboratorial das CCPS. Dentro desta busca, ênfase tem sido dada aos eventos envolvidos no processo da capacitação espermiática (Leahy e Gadella, 2015; Rahman *et al.*, 2017; Bernecic *et al.*, 2019), considerando a importância para a fertilidade e o crescimento nos conhecimentos que envolve este processo. Neste contexto, é importante considerar que a criopreservação do sêmen, durante os processos de congelamento e descongelamento, induz a vários danos espermiáticos, que podem provocar alterações, principalmente nas membranas, que podem levar a perda de moléculas associadas ao processo de capacitação espermiática (Celeghini *et al.*, 2008; Ugur *et al.*, 2019; Longobardi *et al.*, 2020).

Esta revisão tem por objetivo compilar estudos que mostrem a relação entre a capacitação espermiática e a fertilidade do sêmen bovino que passou pelo processo de criopreservação, levando em consideração as técnicas de avaliação e os resultados até o momento. Para isso, serão abordados primeiramente alguns aspectos relacionados aos eventos da capacitação espermiática, seguidos das alterações que os espermatozoides sofrem durante o processo de criopreservação e finalmente serão apontados os resultados de estudos que relacionam as técnicas de análise espermiática aos eventos da capacitação espermiática e fertilidade.

### **Capacitação espermiática: eventos até a fertilização**

A capacitação espermiática é um pré-requisito para a fertilidade e pode ser definida como uma combinação de eventos bioquímicos e moleculares que ocorrem de forma sequencial e paralela, tanto na



cabeça quanto no flagelo, conferindo aos espermatozoides a capacidade de hiperativação da motilidade, interação com a zona pelúcida do oócito, reação acrossomal e fusão com a membrana plasmática do oócito na fecundação (Yanagimachi, 1994; Visconti, 2009; Signorelli *et al.*, 2012). Para alcançar a capacitação espermática, logo após a espermição, os espermatozoides passam por modificações durante o trânsito no epidídimo, o contato com o plasma seminal e o transporte através do trato reprodutivo da fêmea (Belleannée *et al.*, 2011). A necessidade da exposição dos espermatozoides a estes microambientes dinâmicos para alterações de suas funções, se deve ao fato dessas células apresentarem alta condensação do DNA, sendo inertes aos processos de transcrição e tradução (Park *et al.*, 2013) e incapazes de produzirem novas proteínas. Desta forma, para controlar suas funções, os espermatozoides dependem de modificações de proteínas por processos de fosforilação, que ocorrem principalmente nos resíduos de tirosina (Bernecic *et al.*, 2019); bem como dos transcritos adquiridos durante a espermatogênese e o trânsito pós-testicular, que podem regular a tradução de proteínas pós-transcricionalmente (Kim, 2005; Alves *et al.*, 2020).

A capacitação espermática propriamente dita deve ocorrer somente no trato reprodutivo da fêmea, quando os espermatozoides entram em contato com o microambiente uterino e da tuba uterina, que disparam uma série complexa de eventos bioquímicos, que culminam com modificações celulares e moleculares (Rahman *et al.*, 2017). Resumidamente, a concentração de Bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) aumenta substancialmente no trato reprodutivo feminino, principalmente no microambiente da tuba uterina próximo do momento da ovulação. O  $\text{HCO}_3^-$  entra nos espermatozoides através de cotransportadores  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ , presentes na membrana plasmática e aumenta o pH intracelular. Ambos  $\text{HCO}_3^-$  e elevação do pH intracelular ativam uma enzima conhecida como adenilato ciclase solúvel (sACY), que é responsável pela produção de adenosina monofosfato cíclico (AMPC). O AMPC é um segundo mensageiro com efeito direto na atividade da proteína quinase A (PKA). A PKA desempenha um papel crucial na fosforilação de proteínas com resíduos de tirosina, mas também em menor proporção nos resíduos serina/reonina. Ao mesmo tempo, a ativação da PKA modula os canais catiônicos específicos dos espermatozoides (CatSper), estimulando a entrada de íons de cálcio ( $\text{Ca}_2^+$ ), que por sua vez produz alterações no potencial de membrana e também ativam a sACY (Visconti, 2009; Signorelli *et al.*, 2012; Bernecic *et al.*, 2019). Em associação, o  $\text{HCO}_3^-$  produz uma assimetria da membrana plasmática por ativação de enzimas que translocam fosfolípidios de membrana, como fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina; esta translocação dos fosfolípidios aumenta a disponibilidade das moléculas de colesterol para aceitadores externos (Visconti, 2009; Visconti *et al.*, 2011). A soro albumina bovina (BSA), um aceitador de colesterol, que está em concentração elevada no trato reprodutivo das fêmeas, promove o efluxo de colesterol da membrana plasmática, tornando-a mais instável, permitindo a reorganização e a formação de microdomínios lipídicos (balsas lipídicas) para permitir a ligação com a proteína da zona pelúcida 3 (ZP3), um receptor de membrana, e inicia os processos de hiperativação da motilidade e reação acrossomal (Gadella *et al.*, 2008).

A hiperativação da motilidade é caracterizada por batimento flagelar vigoroso e assimétrico e é dependente da entrada de  $\text{Ca}_2^+$  através dos CatSper, presentes na peça principal do flagelo. O propósito biológico deste movimento propulsivo é a liberação de espermatozoides das células da região do istmo da tuba uterina, a travessia pelas células do *cumulus* até a zona pelúcida e, após a reação acrossomal, da zona pelúcida até o espaço perivitelino (Singh e Rajender, 2015; Bernecic *et al.*, 2019).

A reação acrossomal é dependente de  $\text{Ca}_2^+$  e inicia com a ligação entre o espermatozoide e a ZP3, que promove a formação de poros de fusão entre a membrana plasmática e a membrana acrossomal externa. Essa fusão é regulada pela formação de complexos solúveis de N-etilmaleimida sensível ao fator de ativação do receptor de proteína (SNARE), envolvendo fosfolipase C (PLC) e despolimerização da actina (Breitbart *et al.*, 2010; Sosa *et al.*, 2015; Mejía-Flores *et al.*, 2017). Subsequentemente à formação dos poros de fusão, as membranas começam a formar vesículas híbridas (membrana plasmática e membrana acrossomal externa) e liberam o conteúdo de enzimas líticas, contidas no acrossomo, que irão auxiliar na degradação da zona pelúcida (Breitbart *et al.*, 2010; Sosa *et al.*, 2015).

A perda da membrana acrossomal externa e uma grande região da membrana plasmática expõe a membrana acrossomal interna para o meio e permite a ocorrência de modificações na membrana plasmática na região equatorial, principalmente com a realocação da equatorina e da izumo1, para tornar esta região da membrana apta para interagir e sofrer fusão com a membrana plasmática do oócito - oolema (Toshimori, 2011). Após a fusão entre as membranas plasmática espermática e do oócito, ocorre a entrada do espermatozoide dentro do citoplasma do oócito - ooplasma. Esta entrada, ativa o término da meiose II do oócito, ocorrendo a extrusão do segundo corpúsculo polar, dando origem ao óvulo e a formação do pronúcleo feminino. Enquanto isso, o núcleo do espermatozoide sofre desfragmentação formando o pronúcleo masculino. Ocorre então, a fusão dos pronúcleos masculino e feminino, formando o zigoto (Yanagimachi, 1994; Toshimori, 2011; Alves *et al.*, 2020).



### **Avaliações das características espermáticas das partidas de sêmen pós-criopreservação**

A criopreservação do sêmen bovino é fundamental para a ampla aplicação da IATF. Embora novos protocolos estejam sendo desenvolvidos e agentes crioprotetores testados para melhorar a criosobrevivência dos espermatozoides, ainda há uma alta porcentagem de espermatozoides que sofrem danos durante os processos de congelação e descongelação, tornando-os inviáveis para fertilizar o oócito (Celeghini *et al.*, 2008). O processo de criopreservação promove desafios fisiológicos e estruturais aos espermatozoides, provocados pelas mudanças no equilíbrio osmótico, no estresse oxidativo e na formação de cristais de gelo intracelulares (Ugur *et al.*, 2019). Assim, as técnicas para avaliar as partidas de sêmen pós-criopreservação antes de liberá-las para o uso na IATF são cruciais e devem levar em consideração estes desafios sofridos pelas células espermáticas.

Durante o processo de refrigeração, as células são expostas a muitos efeitos nocivos, incluindo desacoplamento metabólico, desequilíbrio iônico, ativação de proteases, acidose celular, privação de energia, transição de fase da membrana, desestabilização do citoesqueleto e produção de radicais livres ou espécies reativas ao oxigênio (ROS), já durante o processo de congelação, os espermatozoides estão predispostos aos efeitos prejudiciais da formação de cristais de gelo, hiperosmolaridade, alterações no volume celular e desnaturação de proteínas (Baust *et al.*, 2009). Assim, o sucesso da criopreservação depende da capacidade das células espermáticas em manterem a habilidade de fertilizar o oócito depois de passarem por todos estes desafios.

A habilidade fértil do espermatozoide advém de diversas características estruturais, morfofuncionais e moleculares, sendo que cada conjunto de características, possui uma correlação diferente com o potencial de fertilidade dos espermatozoides. Avaliações espermáticas que incluem características como motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática, têm sido previamente definidas como técnicas clássicas/convencionais ou primeiro estágio da avaliação (Arruda *et al.*, 2011). Isso se deve ao fato que estas características apresentaram alta correlação com a fertilidade em alguns estudos (Gillan *et al.*, 2008; Arruda *et al.*, 2011; Seidel, 2012; Morrell *et al.*, 2018); no entanto, em outros estudos revelaram resultados divergentes para o potencial de fertilidade (Oliveira *et al.*, 2014; Santos, 2016). Em adição, outras características relacionadas a funcionalidade da estrutura espermática são utilizadas como complemento às análises convencionais, sendo consideradas como o segundo estágio da avaliação espermática (Arruda *et al.*, 2011), já que nestas análises são consideradas a integridade da membrana plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, integridade do DNA, produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS), peroxidação lipídica e outras, trazendo respostas e correlações importantes entre a qualidade espermática e a fertilidade (Waterhouse *et al.*, 2006; Celeghini *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2014; Gliozzi *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2019; Narud *et al.*, 2020). Mesmo assim, resultados divergentes continuam sendo evidenciados entre diferentes touros ou mesmo entre diferentes partidas provenientes do mesmo touro, o que faz questionar sobre os mecanismos moleculares e bioquímicos que os espermatozoides passam, incluindo aqueles envolvidos na habilidade em passar pelo processo de capacitação espermática, além das características intrínsecas, nas quais são considerados conteúdos moleculares e de organelas do espermatozoide (Alves *et al.*, 2020), entrando no que tem sido definido como o terceiro estágio da análise espermática (Arruda *et al.*, 2011).

Atualmente sabe-se que o espermatozoide, durante a fertilização do oócito, entrega, além do DNA, outros fatores importantes ao embrião, tais como os centríolos, RNAs e proteínas (Alves *et al.*, 2017; Alves *et al.*, 2020). Dentre esses fatores, incluem-se os microRNAs (miRNA), que podem regular a tradução de proteínas pós-transcricionalmente (Kim, 2005). Os miRNAs, por serem moléculas estáveis e conservadas entre as espécies, assim como adquiridas via vesículas extracelulares, podem ser potenciais reguladoras da fertilidade e usadas como biomarcadores (Alves *et al.*, 2020) e seu papel têm sido descrito em diferentes fases da espermatogênese (Kotaja, 2014; Yadav; Kotaja, 2014), maturação espermática (Belleannée *et al.*, 2011) e desenvolvimento embrionário inicial (Yuan *et al.*, 2016; Alves *et al.*, 2019), além do seu perfil estar associado com diferentes fenótipos de fertilidade (Fagerlind *et al.*, 2015; Alves *et al.*, 2019).

Com o avanço tecnológico, as estratégias “ômicas” como a genômica, transcriptômica, proteômica, lipidômica e metabolômica têm sido utilizadas para melhorar a compreensão dos eventos moleculares, bem como da determinação de marcadores moleculares da fertilidade de touros (Velho *et al.*, 2018). O proteoma do sêmen bovino é composto por várias proteínas, e a grande maioria destas estão envolvidas no processo de fecundação do espermatozoide ao oócito, e a ausência, presença e/ou subexpressão de proteínas específicas podem alterar as funções espermáticas e, portanto, diminuir a fertilidade do sêmen (Maciel Júnior *et al.*, 2018; Kasimanickam *et al.*, 2019). Em adição, a metabolômica é o estudo global do metaboloma que compreende uma gama de pequenas moléculas (<1500 Da),



denominadas metabólitos, e seus componentes pertencem às diversas classes moleculares como carboidratos, lipídios, aminoácidos, ácidos orgânicos, ácidos nucleicos, vitaminas, polifenóis, alcaloides e outras espécies inorgânicas, motivo pelo qual é considerada a “ômica” mais próxima ao fenótipo; com isso, os metabólitos podem mais facilmente serem correlacionados com o fenótipo das células e/ou dos indivíduos; além do fato de não serem alterados por modificações funcionais como regulações epigenéticas nos genes, e modificações pós-traducionais das proteínas (D’Occhio *et al.*, 2019), essa é uma técnica que tem se mostrado promissora na identificação de potenciais biomarcadores da fertilidade masculina (Kumar *et al.*, 2015; Bieniek *et al.*, 2016).

Pesquisas recentes demonstraram que o plasma seminal de bovinos possui diferentes classes de metabólitos, sendo alguns mais predominantes (Velho *et al.*, 2018). Além disso, diferenças na composição metabólica do plasma seminal foram reportadas em estudos comparativos entre touros de alta e baixa fertilidade (Kumar *et al.*, 2015; Velho *et al.*, 2018; Menezes *et al.*, 2019; Memili *et al.*, 2020). A maioria dos estudos tem focado na metabolômica do plasma seminal, Velho *et al.* (2018) demonstraram que as classes de metabólitos predominantes no plasma seminal de bovinos são os aminoácidos, peptídeos e análogos; além disso, a frutose, ácido cítrico e ácido láctico são os metabólitos mais abundantes. Esses autores ainda identificaram que o ácido 2-oxoglutarico, ácido fosfórico, D-manitol e dulcitol estão em menor abundância no plasma seminal de touros de alta fertilidade; enquanto, frutose, 4-ketoglucose e ácido eritrônico estão em maior abundância em touros de baixa fertilidade. Kumar *et al.* (2015) demonstraram que touros de alta fertilidade apresentam, no plasma seminal, baixas concentrações de citrato e isoleucina e mais alta concentração de triptamina/taurina e leucina. Mais recentemente, Longobardi *et al.* (2020) descreveram que as diferenças de fertilidade em touros estão relacionadas às altas concentrações de glicina-betaina, butirilcarnitina e L-carnitina e baixas concentrações de glicerofosfocolina no plasma seminal de touros baixa fertilidade. Já em relação ao estudo da metabolômica nos espermatozoides de touros com distinto potencial fértil são mais recentes. Menezes *et al.* (2019) descreveram que touros de alta fertilidade possuem menores concentrações de ácido palmítico e maior abundância de GABA, carbamato, ácido benzoico e ácido láctico. Os altos níveis de glicina-betaina nos espermatozoides caracterizam touros de baixa fertilidade (Longobardi *et al.*, 2020). Ainda, Saraf *et al.* (2020) relataram que altas concentrações de hipotaurina, Tg180/180/180, ácido L-malico, decoxiuridine trifosfato, selenocistenina, DITP e metacrilil-CoA são correspondentes com o fenótipo de touros de alta fertilidade. Esses trabalhos focam no estudo do metaboloma global das amostras, associando as diferenças com a fertilidade das partidas e/ou touros.

### Capacitação espermática e fertilidade do sêmen pós-criopreservação

Considerando que a maioria das IATF no Brasil utilizam o sêmen criopreservado, cabe ressaltar que os processos de congelamento e descongelamento podem induzir alterações na arquitetura da membrana plasmática e distúrbios na distribuição do colesterol, eventos também relacionados com a capacitação espermática. Estas crioinjúrias são também chamadas “mudanças semelhantes à capacitação” ou por alguns autores como “criocapacitação” (Thomas *et al.*, 2006; Kadirvel *et al.*, 2009; Talukdar *et al.*, 2015), podendo gerar confundimento em relação à análise do espermatozoide criopreservado e capacitado. Por este motivo, cabe ressaltar a importância em identificar diferenças entre os eventos da capacitação espermática que ocorre no sêmen *in natura* e pós-criopreservação e as lesões espermáticas que ocorrem durante o processo de criopreservação durante a análise de uma amostra capacitada.

Como mencionado anteriormente, os eventos bioquímicos que os espermatozoides sofrem durante o trânsito através do trato reprodutivo da fêmea, a fim de se tornarem capazes de fertilizar o oócito e que culminam com modificações que caracterizam a capacitação espermática, provocam instabilidade da membrana plasmática. A sonda fluorescente Merocianina 540 tem sido utilizada amplamente para detectar a instabilidade da membrana plasmática, sendo utilizada para indicar a população espermática da amostra que está capacitada; no entanto, as lesões das membranas plasmáticas provocadas durante o processo de criopreservação também provocam instabilidade na membrana plasmática que são também detectadas pela Merocianina 540, causando um confundimento entre as populações espermáticas capacitadas (fisiológico) e aquelas com danos causados pela criopreservação (crioinjúria), erroneamente chamada de criocapacitação (Leahy e Gadella, 2015). Embora, hajam várias técnicas para avaliar os diferentes eventos que ocorrem na cascata da capacitação espermática (Bernecic *et al.*, 2019), a grande maioria tem sua aplicação somente em grandes centros de pesquisa, considerando o custo, a estrutura e o tempo necessários para sua realização, estando distantes de serem aplicadas de forma rotineira na triagem de partidas de sêmen criopreservado que serão liberadas para o uso em inseminação artificial. Em vista da importância destes eventos para a fertilização do oócito, e do fato que estas modificações podem ser confundidas com as alterações que



ocorrem durante o processo de criopreservação, surge a necessidade de novas formas de avaliação espermática que permitam detectar estes eventos e relacioná-los com o potencial de fertilidade do sêmen criopreservado. Uma das etapas da capacitação é a depleção do colesterol da membrana plasmática e a redistribuição do colesterol remanescente da região equatorial para a apical de forma organizada, formando as chamadas “balsas lipídicas”; induzindo a fosforilação dos resíduos de tirosina das proteínas da membrana plasmática e provocando a hiperativação da motilidade, bem como indução da reação acrossomal (Leemans *et al.*, 2019). A Filipina é um antibiótico macrolídeo polieno fluorescente que se liga especificamente ao colesterol (Flesch *et al.*, 2001), sendo capaz de marcar a distribuição das moléculas do colesterol sobre a cabeça do espermatozoide (Zerbinati *et al.*, 2017), o que pode refletir em diferentes padrões e permitir diferenciar os espermatozoides capacitados daqueles com crioinjúrias.

Recentemente, identificou-se alteração do perfil de miRNAs de espermatozoides relacionados à capacitação espermática, sendo estes envolvidos na fosforilação da tirosina, nas vias de sinalização PI3-Akt, MAPK, CAMP-PKA e Ca<sup>++</sup> (Li *et al.*, 2018), outros associados aos CatSper (Chávez *et al.*, 2013; Singh e Rajender, 2015). Ainda assim, são escassos os estudos que evidenciem a ação dos miRNAs nas vias de sinalização associadas ao processo de capacitação em bovinos. De fato, durante este processo chave para a fecundação, ocorrem alterações moleculares desses transcritos importantes nos espermatozoides (Rahman *et al.*, 2014).

A fim de estudar os eventos metabólicos pós-ejaculatórios, Baker *et al.* (2013) demonstraram aumento da concentração de frutose-6-fosfato e diminuição dos níveis de colesterol, demosterol, frutose, glucose 1 Mox, 5-TMS, L-Tirosina, beta-Sitosterol, mio-inositol, manose, octadecanamide, ácido láctico, glucose-6-fosfato, ribose-6-fosfato e galactose em espermatozoides murinos capacitados. O fato da maioria dos metabólitos encontrados estarem em baixas concentrações em amostras que passaram pelo processo de capacitação é condizente com o fato de que os espermatozoides são células em catabolismo e incapazes de sintetizarem muitos metabólitos por conta própria (O’Shea e Voglmayr, 1970). Norteados futuros estudos do metaboloma espermático relacionado aos eventos da capacitação espermática.

Esses conhecimentos possuem enorme importância no que diz respeito à melhor compreensão dos fatores envolvidos na capacitação espermática e, possivelmente, esses componentes moleculares podem estar envolvidos na diferenciação do potencial fértil dos espermatozoides. Entretanto, existe uma lacuna literária em relação ao envolvimento dos eventos ligados à cascata da capacitação espermática na diferenciação da fertilidade de ejaculados bovinos.

### Considerações finais

O potencial de fertilidade do sêmen criopreservado de touros tem sido objeto de intensos e profundos estudos e ainda não há a compreensão de todos os eventos que estão envolvidos no sucesso da fecundação. Estudar o processo de capacitação espermática em touros de fertilidade conhecida, bem como os fatores envolvidos na diferença de fertilidade, parece ser o passo seguinte para identificar as falhas que expliquem as diferenças de fertilidade entre touros, para em seguida contribuir com o desenvolvimento de ferramentas técnicas para o diagnóstico acurado de partidas de sêmen com alto potencial de fertilidade, evitando-se prejuízos aos produtores.

### Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processos 2020/14918-3, 2022/12878-0 e 2022/15204-0) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processos 312510/2021-7 e 402601/2022-0).

### Referências

- ABIEC - Associação Brasileira das indústrias Exportadoras de Carnes Bovinas Beef report: Perfil da pecuária no Brasil. [s.l.] (ABIEC), 2022.
- Alves MBR, Arruda RP, De Bem THC, Florez-Rodriguez SA, Sá Filho MF, Belleannée C, Meirelles FV, Da Silveira JC, Percin F, Celeghini ECC. Sperm-borne miR-216b modulates cell proliferation during early embryo development via K-RAS. *Scientific Reports*, v.9, n.1, p.1-14, 2019.
- Alves MBR, Arruda RP, Silveira JC, Percin F, Celeghini ECC. MicroRNAs: uma nova abordagem para a predição da fertilidade em touros. *Rev Bras Reprod Anim*, v.41, p.46-53, 2017.
- Alves MBR, Celeghini ECC, Belleannée C. From sperm motility to sperm-borne microRNA signatures:



- new approaches to predict male fertility potential. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v.8, p.791, 2020.
- Arruda RP, Celeghini ECC, Alonso MA, Carvalho HF, Oliveira L.Z, Nascimento J, Silva DF, Affonso FJ, Lemes KM, Jaimes JD.** Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros, *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, n.2, p.145-151, 2011.
- ASBIA - Associação Brasileira de Inseminação Artificial, Relatório INDEX, 2021.
- Baker MA, Weinberg AS, Hetherington L, Velkov T, Aitken RJ.** Post-ejaculatory changes in the metabolic status of rat spermatozoa as measured by GC-MS. *Metabolomics*, v.9, p.708-721, 2013.
- Baruselli OS, Santos GFF, Crepaldi GA, Catussi BLC, Oliveira ACS.** IATF em números: evolução e projeção futura. *Rev Bras Reprod Anim*, v.46, n.2, p.76-83, 2022.
- Baust JG, Gao D, Baust JM.** Cryopreservation: an emerging paradigm change. *Organogenesis*, v.5, n.3, p.90-96, 2009. <doi: 10.4161/org.5.3.10021>.
- Belleannée C, Labas V, Teixeira-Gomes AP, Gatti JL, Dacheux JL, Dacheux F.** Identification of luminal and secreted proteins in bull epididymis. *J Proteomics*, v.74, p.59-78, 2011.
- Bernecic NC, Gadella BM, Leahy T, Graaf SP.** Novel methods to detect capacitation-related changes in spermatozoa. *Theriogenology*, v.139, p.56 - 66, 2019.
- Bieniek JM, Drabovich AP, Lo KC.** Seminal biomarkers for the evaluation of male infertility. *Asian J Androl*, v.18, n.3, p.426-33, 2016.
- Breitbart H, Rotman T, Rubinstein S.** Role and regulation of PI3K in sperm capacitation and the acrosome reaction. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.314, n.2, p.234-8, 2010.
- CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.
- Celeghini ECC, Alves MBR, Arruda RP, Rezende GM, Florez-Rodriguez SA Sá Filho MF** Efficiency of CellROX deep red® and CellROX orange® fluorescent probes in identifying reactive oxygen species in sperm samples from high and low fertility bulls. *Anim Biotechnology*, v.32, n.1, p.77-83, 2019. <doi: 10.1080/10495398.2019.1654485>
- Celeghini ECC, Arruda RP, Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF, Rodrigues PHM.** Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Anim Reprod Sci*, v.104, p.119-131, 2008.
- Celeghini ECC, Arruda RP, Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF.** Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reprod Dom Anim*, v.42, p.479-488, 2007.
- Celeghini ECC, Arruda RP, Florez-Rodriguez AS, Santos FB, Alves MBR, Oliveira BMM.** Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.41, n.1, p.40-45, 2017.
- Chávez JC, De La Vega-Beltrán JL, Escoffier J, Visconti PE, Treviño CL, Darszon A, Salkoff L, Santi CM.** Ion permeabilities in mouse sperm reveal an external trigger for SLO3-dependent hyperpolarization. *PLoS One*, v.1, p.1-13, 2013.
- D'Occhio MJ, Baruselli PS, Campanile G.** Metabolic health, the metabolome and reproduction in female cattle: a review. *Italian J Anim Sci*, v.18, n.1, p.858-867, 2019.
- Fagerlind M, Stalhammar H, Olsson B, Klinga-Levan K.** Expression of miRNAs in bull spermatozoa correlates with fertility rates. *Reprod Dom Anim*, v.50, p.587-594, 2015.
- Flesch FM, Brouwers JFHM, Nievelstein PFEM, Verkleij AJ, Van Golde LMG, Colenbrander B, Gadella BM.** Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J Cell Sci*, v.114, n.19, p.3543-3555, 2001.
- Gadella BM, Tsai PS, Boerke A, Brewis IA.** Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *Int J Dev Biol*, v. 52, n. 5-6, p. 473-80, 2008. <doi: 10.1387/ijdb.082583bg>.
- Gillan L, Kroetsch T, Chis Maxwell WM, Evans G.** Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Anim Reprod Sci*, v.103, p.201-214, 2008.
- Glozzi TM, Turri F, Manes S, Cassinelli C, Pizzi F.** The combination of kinetic and flow cytometric semen parameters as a tool to predict fertility in cryopreserved bull semen. *Animal*, v.11, p.1975-1982, 2017.
- Kadirvel G, Kumar S, Kumaresan A, Kathiravan P.** Capacitation status of fresh and frozen-thawed buffalo spermatozoa in relation to cholesterol level, membrane fluidity and intracellular calcium. *Anim Reprod Sci*, v.116, p.244-53, 2009.
- Kasimanickam RK, Kasimanickam VR, Arangasamy A, Kastelic JP.** Sperm and seminal plasma proteomics of high- versus low-fertility Holstein bulls. *Theriogenology*, v.126, p.41-48, 2019. <doi:



- 10.1016/j.theriogenology.2018.11.032>.
- Kim VN.** MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews. Molecular and Cellular Biology*, v.6, n.5, p.376–385, 2005.
- Kotaja N.** MicroRNAs and spermatogenesis. *Fertility and Sterility*, v.101, n.6, p.1552–1562, 2014.
- Kumar A, Kroetsch T, Blondin P, Anzar M.** Fertility-associated metabolites in bull seminal plasma and blood serum: 1H nuclear magnetic resonance analysis. *Mol Reprod Develop*, v.82, n.2, p.123–31, 2015.
- Leahy T, Gadella BM.** New insights into the regulation of cholesterol efflux from the sperm membrane. *Asian Journal of Andrology*, v.17, n.4, p.561–567, 2015.
- Leemans B, Stout TAE, De Schauwer C, Heras S, Nelis H, Hoogewijs M, Soom AN, Gadella BM.** Update on mammalian sperm capacitation: how much does the horse differ from other species? *Reproduction*, v.157, n.5, p.181–197, 2019.
- Li Y, Li RH, Ran MX.** High throughput small RNA and transcriptome sequencing reveal capacitation-related microRNAs and mRNA in boar sperm. *BMC Genomics*, v.19, n.1, p.1–12, 2018.
- Longobardi V, Kosior MA, Pagano N, Fatone G, Staropoli A, Vassetti A, Vinale F, Campanile G, Gasparrini B.** Change in bull semen metabolome in relation to cryopreservation and fertility. *Animals*, v.10, p.1065, 2020.
- Maciel JR VL, Caldas-Bussiere MC, Silveira V.** L-arginine alters the proteome of frozen-thawed bovine sperm during in vitro capacitation. *Theriogenology*, v.119, p.1–9, 2018.
- Mejía-Flores I, Chiquete-Félix N, Palma-Lara.** During capacitation in bull spermatozoa, actin and PLC- $\zeta$  undergo dynamic interactions. *Zygote*, v.25, n.5, p.558–566, 2017.
- Memili E, Moura AA, Kaya A.** Metabolomes of sperm and seminal plasma associated with bull fertility. *Animal Reproduction Science*, v.220, artigo 106355, 2020.
- Menezes EB, Velho ALC, Santos F.** Uncovering sperm metabolome to discovery biomarkers for bull fertility. *BMC Genomics*, v.20, n.174, p.2–16, 2019.
- Morrell JM, Valeanu AS, Lundeheim N, Johannisson A.** Sperm quality in frozen beef and dairy bull semen. *Acta Vet Scand*, v.60, n.1, artigo 41, 2018. <doi: 10.1186/s13028-018-0396-2>
- Narud B, Klinkenberg G, Khezri A, Zeremichael TT, Stenseth E-B, Nordborg A, Haukaas TH, Morrell JM, Heringstad B, Myromslien FD, Kommisrud E.** Differences in sperm functionality and intracellular metabolites in Norwegian Red bulls of contrasting fertility. *Theriogenology*, v.157, p.24–32, 2020.
- O’Shea T, Voglmayr JK.** Metabolism of glucose, lactate, and acetate by testicular and ejaculated spermatozoa of the ram. *Biol Reprod*, v.2, p.326–332, 1970.
- Okano DS, Penitente-Filho JM, Gomez León VE, Maitan PP, Silveira CO, Waddington B, Díaz-Miranda EA, Costa EP, Guimarães SEF, Guimarães JD.** In vitro evaluation of cryopreserved bovine sperm and its relation to field fertility in fixed-time artificial insemination. *Reprod Dom Anim*, v.54, n.3, p. 604–612, 2019. <<https://doi.org/10.1111/rda.13401>>
- Oliveira BMM, Arruda RP, Thomé HE, Maturana Filho M, Oliveira GC, Guimarães CF, Nichi M, Silva LA, Celeghini ECC.** Fertility and uterine hemodynamic in cows after artificial insemination with semen assessed by fluorescent probes. *Theriogenology*, v.82, p.767–772, 2014.
- Park YJ, Kim J, You YA, Pang M.** Proteomic revolution to improve tools for evaluating male fertility in animals. *J Proteome Res*, v.12, p.4738–4747, 2013.
- Rahman MS, Kwon WS, Pang MG.** Calcium influx and male fertility in the context of the sperm proteome: an update. *BioMed Res Int*, v.2014, 841615, 2014.
- Rahman MS, Kwon WS, Pang MG.** Prediction of male fertility using capacitation-associated proteins in spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, v.84, p.749–759, 2017.
- Santos FB.** Relação da qualidade do sêmen com a fertilidade após IATF em vacas de corte. 2016. 62f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
- Saraf KK, Kumaresa A, Dasgupta M, Karthikkeyan G, Prasad TSK, Modi PK, Ramesha K, Jeyakumar S, Manimaran A.** Metabolomic fingerprinting of bull spermatozoa for identification of fertility signature metabolites. *Mol Reprod Develop*, v.87, p.692–703, 2020.
- Seidel GE.** Several insights on evaluation of semen. *Anim Reprod*, v. 9, p.329–332, 2012.
- Signorelli J, Diaz ES, Morales P.** Kinases, phosphatases and proteases during sperm capacitation. *Cell & Tissue Res*, v.349, n.3, p.765–782, 2012.
- Silva EFSJ, Missio D, Martinez CS, Vassallo DV, Peçanha FM, Leivas FG, Brum DS, Wiggers GA.** Mercury at environmental relevant levels affects spermatozoa function and fertility capacity in bovine sperm. *J Toxicol Environ Health A*, v.82, p.268–278, 2019.



- Singh AP, Rajender S.** CatSper channel, sperm function and male fertility. *Reprod BioMed Online*, v.30, p.28–38, 2015.
- Sosa CM, Pavarotti MA, Zanetti MN, Zoppino FCM, De Blas GA, Mayorga LS.** Kinetics of human sperm acrosomal exocytosis. *Mol Hum Reprod*, v.21, n.3, p.244-254, 2015.
- Talukdar DJ, Ahmed K, Talukdar P.** Cryocapacitation and fertility of cryopreserved semen. *Int J Liv Res*, v.5, p.11–18, 2015.
- Thomas AD, Meyers SA, Ball BA.** Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology*, v.65, p.1531–50, 2006.
- Toshimori K.** Dynamics of the mammalian sperm membrane modification leading to fertilization: a cytological study. *J Electron Microscopy*, v.60 (Supplement 1), p.S31–S42, 2011. <doi: 10.1093/jmicro/dfr036>
- Uehara Berton TI, Silva MF, Belonci MMF, Barbosa BA, Paulucci SR, Monteiro FNB.** Impacto da qualidade de sêmen sobre os resultados da IATF. *Rev Bras Reprod Anim*, v.46, n.2, p.84-90, 2022.
- Ugur MR, Abdelrahman AS, Evans HC, Gilmore AA, Hitit M, Arifiantini RI, Purwantara B, Kaya A, Memili E.** Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. *Front Veter-Sci.*, v.6, artigo 268, 2019. <doi: 10.3389/fvets.2019.00268>.
- Velho ALC, Menezes E, Dinh T, Kaya A, Topper E, Moura AA, Memili E.** Metabolomic markers of fertility in bull seminal plasma. *Plos One*, v.13, n.4, p.1-20, 2018.
- Visconti PE.** Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proc Natl Acad Sci*, v. 106, n. 3, p. 667-8, 2009. <doi:10.1073/pnas.0811895106>.
- Visconti PE, Krapf D, De La Vega-Beltran JL, Acevedo JJ, Darszon A.** Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl*, v.13, p.395–405, 2011.
- Waterhouse KE, Haugan T, Kommisrud E, Tverdal A, Flatberg G, Farstad W, Evenson DP, DE Angelis PM.** Sperm DNA damage is related to field fertility of semen from young Norwegian Red bulls. *Reprod, Fert Dev*, v.18, p.781-788, 2006.
- Yadav RP, Kotaja N.** Small RNAs in spermatogenesis. *Mol Cel Endocrinol*, v.382, n.1, p.498-508, 2014.
- Yanagimachi R.** Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*, v.2, p.371-372, 1994.
- Yuan S, Schuster A, Tang C.** Sperm-borne miRNAs and endo-siRNAs are important for fertilization and preimplantation embryonic development. *Development*, v.143, p.635–647, 2016.
- Zerbinati C, Caponecchia L, Puca R, Ciacciarelli M, Salacone P, Sebastianelli A, Pastore A, Palleschi G, Petrozza V, Porta N, Rago R, Carbone A, Iuliano L.** Mass spectrometry profiling of oxysterols in human sperm identifies 25-hydroxycholesterol as a marker of sperm function. *Redox Biol*, v.11, p.111-117, 2017.
-