



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MYRIAN MEGUMY TSUNOKAWA HIDALGO

**RELAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA PROAKAP4 EM  
ESPERMATOZOIDES EJACULADOS E EPIDIDIMÁRIOS  
CRIOPRESERVADOS DE FELINOS DOMÉSTICOS (*Felis  
silvestris catus*) E AVALIAÇÃO DA METILAÇÃO DO DNA  
EM ESPERMATÓZOIDES CRIOPRESERVADOS DE  
TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**

---

Londrina  
2024

MYRIAN MEGUMY TSUNOKAWA HIDALGO

**RELAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA PROAKAP4 EM  
ESPERMATOZOIDES EJACULADOS E EPIDIDIMÁRIOS  
CRIOPRESERVADOS DE FELINOS DOMÉSTICOS (*Felis  
silvestris catus*) E AVALIAÇÃO DA METILAÇÃO DO DNA  
EM ESPERMATÓZOIDES CRIOPRESERVADOS DE  
TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Ciência Animal da Universidade Estadual de  
Londrina - UEL, como requisito parcial para a  
obtenção do título de Doutor.

Orientador: Profa. Dra. Maria Isabel Mello Martins

Londrina  
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

M098r Hidalgo, Myrian Megumy Tsunokawa .  
Relação da concentração da proAKAP4 em espermatozoides ejaculados e epididimários criopreservados de felinos domésticos (*Felis silvestris catus*) e avaliação da metilação do DNA de espermatozoides criopreservados de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo. - Londrina, 2024.  
138 f. : il.

Orientador: Maria Isabel Mello Martins.  
Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2024.  
Inclui bibliografia.

1. Kit Elisa - Tese. 2. Epigenética - Tese. 3. Gatos - Tese. 4. Peixes - Tese. I. Martins, Maria Isabel Mello . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619

MYRIAN MEGUMY TSUNOKAWA HIDALGO

**RELAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA PROAKAP4 EM  
ESPERMATOZOIDES EJACULADOS E EPIDIDIMÁRIOS  
CRIOPRESERVADOS DE FELINOS DOMÉSTICOS (*Felis  
silvestris catus*) E AVALIAÇÃO DA METILAÇÃO DO DNA  
EM ESPERMATÓZOIDES CRIOPRESERVADOS DE  
TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação  
em Ciência Animal da Universidade Estadual de  
Londrina - UEL, como requisito parcial para a  
obtenção do título de Doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Orientador: Profa. Dra. Maria Isabel  
Mello Martins  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Thales Ricardo Rigo Barreiros  
Universidade Estadual do Norte do Paraná -  
UENP

---

Prof. Dr. Fábio Morotti  
Universidade Estadual de Londrina- UEL

---

Prof. Dra. Lucienne Garcia Pretto Giordano  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa Dra. Amanda Fonseca Zangirolamo  
Universidade Estadual de Londrina- UEL

Londrina, 26 de abril de 2024

Dedico este trabalho

Ao meu esposo **Douglas Martins Cecconello**,

Ao meu pai **João Bastart Hidalgo**,

À minha mãe **Yurie Tsunokawa Hidalgo**.

Pelo apoio e amor incondicional, pelas sábias palavras em todos os momentos da minha vida e por todas as orações ao meu favor.

## AGRADECIMENTOS

Sobretudo à DEUS, pela minha vida, pela minha saúde, e por me permitir superar todas as provações encontradas ao longo da realização desse trabalho. Obrigada DEUS por me iluminar e me fazer acreditar que tudo é possível àquele que crê. À ELE toda honra e toda a glória.

Ao meu amor, Douglas Martins Cecconello, você, para mim, é a essência de I coríntios 13: 7-8. Nesta passagem; “O amor tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta, o amor jamais acaba”, o apóstolo Paulo ressalta o valor e o poder do amor, uma força que é ao mesmo tempo inabalável e imutável. Em 2021 e 2022, nós atravessamos por um período emocionalmente falando, crítico. Você vivenciou o “despenhadeiro” comigo, você esteve lá por mim. Obrigada por não desistir de mim, suportar essa dor comigo e me trazer de volta. E agora, nestas últimas semanas, novamente estamos atravessando por tempos difíceis. Quero que saiba que, independentemente de qualquer situação, nós estaremos sempre juntos. Eu te amo.

Aos meus heróis, meus pais, João Bastart Hidalgo e Yurie Tsunokawa Hidalgo, vocês sempre foram e serão minha grande inspiração, meus maiores espelhos. Obrigada por todo amor, carinho, força e por todo apoio que sempre me deram. Com vocês eu aprendi que a vida é difícil sim, mas se tivermos DEUS no comando, o fardo se torna mais leve. Se cair, é só se levantar e recomeçar, porque o esforço sempre valerá a pena.

À minha mestra, orientadora Maria Isabel Mello Martins, à quem eu tenho grande apreço como professora, pesquisadora e como mulher. Agradeço imensamente por ter me acolhido desde o primeiro momento, proporcionando inúmeras oportunidades ao longo desses anos e ter acreditado no meu potencial. Obrigada por ser também amiga e manter sempre a porta aberta para conversas (tipo psicóloga; risadas e choros), pela orientação, ensinamentos compartilhados, carinho, compreensão, por me estimular a querer sempre mais e a aproveitar cada oportunidade. Serei sempre grata.

À toda equipe do LARAA- Laboratório de Andrologia e Reprodução Animal Assistida: em especial a minha, pra sempre, “best” Bia Marques (a princess dos gatos); amiga, obrigada por toda a parceria e risadas nos quatro anos que

estivemos trabalhando juntas, Letícia (a paciência); obrigada por todas as palavras de apoio e carinho, vou sentir saudade dos nossos cafés com brigadeiro, Luiz Guilherme (o nerd); obrigada por ser nossa enciclopédia e nos ajudar nas estatísticas, Júlia (o furacão dominante); Braba com “B” maiúsculo, amiga, você é incrível e eu vou sentir saudade de fofocar com você todos os dias, Vinícius (o dramático); o que faz drama até para segurar um gato na janela do laboratório, Natália (menina exemplo e a delicadeza); a elegância em pessoa, amiga você é um exemplo de força e dedicação para todos nós e Bruno (o jornalista), que chegou depois, mas que está presente na minha vida todos os dias. Agradeço imensamente a todos, por toda a ajuda na execução do trabalho com as feras felinas, por todo companheirismo, paciência e todos os ensinamentos compartilhados. E hoje, refletindo, sobre todos os lugares que eu passei como aluna ou colaboradora de pesquisa, eu tive a certeza de que, não existe equipe igual a nossa. Aqui só mora gente do bem e com muito talento. Meu sentimento é de gratidão e muito orgulho de ter feito parte desse time de sucesso. Juntos sempre seremos mais fortes.

À equipe NorBRAQUA, professores Jorge Manuel O. Fernandes, Maria Isabel Mello Martins, Laurival Villas-Boas e Lucienne Garcia Pretto-Giordano por me proporcionarem a oportunidade de desenvolver um projeto como colaboradora junto a Nord University, Noruega. Obrigada por confiarem em mim e no meu trabalho, o apoio de todos, foi essencial para a execução e finalização do projeto. Posso afirmar que esta experiência me fez crescer e alavancar tanto como pessoa quanto profissional. Foi uma oportunidade “de ouro” e me sinto honrada de ter participado e ter contribuído com a Pesquisa. Quero agradecer também aos demais colaboradores da Nord University que de alguma forma contribuíram com o desenvolvimento do estudo: Lorena Rudick, Renan Appel e Partha Tripathy.

Ao professor Thales Ricardo Rigo Barreiros, que foi meu professor e orientador na graduação e meu supervisor na residência, agradeço por todos os ensinamentos compartilhados, por todo apoio e parceria. Obrigada por ter acreditado em mim, na minha força e dedicação e ter me apresentado o mundo da ciência e pesquisa.

Aos professores Fabiana Ferreira de Souza (menínassss) e João Carlos Pinheiro Ferreira, agradeço imensamente pela recepção na UNESP-FMVZ e por toda a ajuda no desenvolvimento dos estudos das proteômicas dos felinos. Vocês

são professores no qual tenho muita admiração.

Aos membros da Banca: Prof. Thales, Prof. Fábio Morotti e Profa Lucienne e Profa Amanda, agradeço imensamente por terem aceitado o convite para a banca e pela compreensão em relação ao prazo de envio da Tese.

Agradeço ao programa de pós-graduação em Ciência Animal e à Universidade Estadual de Londrina, e a todos os funcionários, que proporcionaram os recursos essenciais para a realização dos experimentos, e tanto colaboraram com a minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de doutorado acadêmico.

"Peça à Deus que abençoe os seus planos, e eles darão certo."  
(Provérbios 16:3)

## PREFÁCIO

Esta tese, foi inicialmente planejada como um estudo único com abordagem de temas apenas com a espécie felina (*Felis silvestris catus*). No entanto, no último período de doutorado, surgiu a oportunidade de participar do programa de Internacionalização NorBraqua na instituição *Nord University*, Bodø – Noruega, como pesquisadora-colaboradora em projeto de pesquisa com Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Devido a proporção e extensão do conteúdo, bem como, a particularidade de cada espécie, optou-se por dividir a tese em dois capítulos. O primeiro capítulo conta com dois artigos que traz informações inéditas e reforçam a importância do tempo de administração do agonista  $\alpha 2$ -adrenérgico na colheita de sêmen por cateterização uretral e da quantificação da proteína proAKAP4 como biomarcador de fertilidade. O segundo capítulo aborda a relação da criopreservação na epigenética espermática, ou seja, seus consequentes efeitos tanto na qualidade quanto no padrão de metilação do DNA.

Desejo a todos uma boa leitura e que todos os médicos veterinários, doutores, mestres e acadêmicos em formação extraia o melhor deste estudo.

**Myrian**

HIDALGO, Myrian Megumy Tsunokawa. **Relação da concentração da proakap4 em espermatozoides ejaculados e epididimários criopreservados de felinos domésticos (*Felis silvestris catus*) e avaliação da metilação do DNA de espermatozoides criopreservados de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).** 2024. 138 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

## RESUMO

Dois estudos foram conduzidos para investigar a importância da qualidade dos espermatozoides na fertilidade masculina. O primeiro estudo teve como objetivo avaliar a relação da proAKAP4 em espermatozoides criopreservados em felinos domésticos. Foram utilizados 15 gatos adultos, submetidos a colheita de sêmen por cateterização uretral e recuperação da cauda do epidídimo. Em seguida, foram realizadas análises espermáticas (cinética, concentração, morfologia, integridade de membrana) e as amostras foram criopreservadas. Após criopreservação foram realizadas novas análises espermáticas e a quantificação da proAKAP4. Foi observada uma maior concentração de proAKAP4 em espermatozoides ejaculados  $30,43 \pm 3,45$  ng/mL (15,26-59,18 ng/mL) comparado aos epididimários  $20,51 \pm 1,87$  ng/mL (12,15-35,36 ng/mL) ( $P=0,004$ ). Foi possível observar relação da concentração da proAKAP4 com os parâmetros: MT ( $r^2 = 0,660$ ,  $P<0,001$ ) e dance ( $r^2 = 0,266$ ,  $P = 0,049$ ) no grupo ejaculado e relação com MT ( $r^2 = 0,668$ ,  $P <0,001$ ) e células estáticas ( $r^2 = 0,74$ ,  $P = 0,003$ ) no grupo do epidídimo, sugerindo que a concentração da proAKAP4 pode ser utilizada como biomarcador de motilidade. O segundo estudo teve como objetivo avaliar a metilação do DNA em espermatozoides criopreservados de tilápia do nilo. Foram utilizados seis machos, em que o sêmen foi colhido por massagem abdominal e em seguida, foram realizadas análises espermáticas (cinética, concentração, morfologia, integridade de membrana e metilação do DNA) e as amostras foram criopreservadas. Foi realizada a extração do DNA e a preparação das bibliotecas das amostras frescas e descongeladas. O estudo revelou que houve mudança no perfil de metilação do DNA em espermatozoides de tilápia do Nilo.

**Palavras-chave:** Kit Elisa. Epigenética. Gatos. Peixes. Fertilidade.

HIDALGO, Myrian Megumy Tsunokawa. **Relationship of proakap4 concentration on cryopreserved ejaculated and epididymal spermatozoa from domestic felines (*Felis silvestris catus*) and evaluation of DNA methylation of cryopreserved spermatozoa from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)** 2024.138pp. Thesis (Doctorate degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

## ABSTRACT

Two studies were conducted to investigate the importance of sperm quality in male fertility. The first study aimed to evaluate the relationship of proAKAP4 concentration on cryopreserved sperm in domestic felines. In this study, 15 adult cats were used, semen was collected by urethral catheterization and sperm recovered from epididymis tail. Then, sperm analyzes were carried out (kinetics, concentration, morphology, membrane integrity) and the samples were cryopreserved. After cryopreservation, new sperm analyzes and proAKAP4 quantification were carried out. A higher concentration of ejaculated proAKAP4 sperm was observed  $30.43 \pm 3.45$  ng/mL (15.26-59.18 ng/mL) compared to epididymal  $20.51 \pm 1.87$  ng/mL (12.15- 35 .36 ng/mL) ( $P=0.004$ ). It was possible to observe a relationship between the proAKAP4 concentration and the parameters: MT ( $r_2 = 0.660$ ,  $P<0.001$ ) and dance ( $r_2 = 0.266$ ,  $P = 0.049$ ) in the ejaculated sperm and relationship between the proAKAP4 concentration and MT ( $r_2 = 0.668$ ,  $P <0.001$ ) and static cells ( $r_2 = 0.74$ ,  $P = 0.003$ ) in the epididymis sperm, suggesting that proAKAP4 concentration can be used as a motility biomarker. The second study aimed to evaluate DNA methylation in cryopreserved Nile tilapia sperm. To this end, 6 males were used, semen was collected by abdominal massage and then sperm analyzes were carried out (kinetics, concentration, morphology, membrane integrity and DNA methylation) and the samples were cryopreserved. DNA extraction and library preparation and bisulfite conversion from fresh and thawed samples were performed. The study revealed that there was a change in the DNA methylation profile in Nile tilapia sperm.

**Key-words:** Elisa kit. Epigenetics. Cats. Fish. Fertility.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

#### Referencial Teórico

**Figura 1** – Representação gráfica da trajetória do espermatozoide avaliado pelo sistema CASA .....32

**Figura 2** – Representação gráfica da expressão da proAKAP4 no espermatozoide.....34

#### Artigo 2

**Figura 1** – Overview of experimental design. Day 1: sperm collection, sperm analysis and cryopreservation. After 48h: recovering of epididymal tail spermatozoa, sperm analysis and cryopreservation. Post-thawed: sperm analysis of both sperm collection methods and proAKAP4 quantification.....81

**Figura 2** – ProAKAP4 concentration in ejaculate and epididymis group after cryopreservation.....82

**Figura 3** – Graphical representation of the regression coefficient and equation between the proAKAP4 concentrations and total motility (A) and dance (B) in the ejaculated group and total motility (C) and static sperm (D) in the epididymis group.....82

## CAPÍTULO 2

### Referencial Teórico

**Figura 1** – Esquema representativo que mostra os efeitos de vários sinais ambientais na metilação do DNA ..... 99

### Artigo 1

**Figura 1** – Overview of experimental design. First step: sperm collection and sperm analysis. Second step: sperm dilution, freezing of samples and analysis. Third step: DNA extraction and DNA methylation analysis... 129

**Figura 2** – Histogram showing the distribution of the number of paired cytosines according to each male, comparison between fresh and cryopreservation..... 132

**Figura 3** – Principal Component Analysis showing the distribution of the fresh and cryopreserved sperm..... 132

**Figura 4** – Potentially sensitive regions after cryopreservation..... 133

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

#### Artigo 2

**Tabela 1** – Sperm concentration, sperm morphology, plasma membrane integrity .80

**Tabela 2** – Linear Regression analysis results (r square and P value) .....82

### CAPÍTULO 2

#### Artigo 1

**Tabela 1** – Sperm morphology, membrane integrity and kinetic parameters of  
nile tilapia ..... 130

**Tabela 2** – Summary of the sequencing data obtained in the RRBS analysis..... 131

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKAP3	Proteína Ancoradora da Quinase-3
AKAP4	Proteína Ancoradora da Quinase-4
ALH	Amplitude do deslocamento lateral de cabeça
BCF	Frequência do batimento flagelar cruzado
CASA	Análise computadorizada de sêmen
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CEUA	Comitê de ética de uso de animais
DANCE	Relação VCL X ALH
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROS	Espécies reativas de oxigênio
LIN	Linearidade
MT	Motilidade total
MP	Motilidade progressiva
mg/Kg	Miligramas por quilo
mL	Mililitros
µL	Microlitros
mM	Milimolar
µm/s	Micrometros por segundo
PI	Iodeto de propídeo
PKA	Proteína Quinase A
ProAKAP4	Precursora da Proteína Ancoradora da Quinase-4
RAS	Sistema de Recirculação Aquícola
STR	Linearidade
UEL	Universidade Estadual de Londrina

VAP	Velocidade média do trajeto
VCL	Velocidade curvilínea
VSL	Velocidade progressiva
WOB	Taxa de oscilação

# SUMÁRIO

## CAPÍTULO I

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>22</b>
2.1	ASPECTOS REPRODUTIVOS DO MACHO.....	22
2.2	IMPORTÂNCIA DA CONSERVAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES DO FELINO .....	23
2.3	MÉTODOS DE COLHEITA ESPERMÁTICA.....	25
2.3.1	Eletroejaculação .....	25
2.3.2	Vagina artificial .....	26
2.3.3	Ejaculação farmacológica .....	26
2.3.4	Recuperação espermática da cauda do epidídimo .....	27
2.4	ANÁLISE ESPERMÁTICA.....	28
2.4.1	Morfologia e integridade de membrana plasmática .....	29
2.4.2	Cinética espermática .....	30
2.4.3	A proAKAP4 como biomarcador da qualidade espermática .....	32
2.5	CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA .....	35
<b>3</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>HIPÓTESE .....</b>	<b>55</b>
<b>5.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>56</b>
5.1	OBJETIVO GERAL.....	56
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	56
<b>6</b>	<b>ARTIGO A–Comparison of two pharmacological sêmen collection times with <math>\alpha</math>2-adrenergic agonist in domestic cat.....</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>ARTIGO B–Relationship of proAKAP4 concentrations in cryopreserved ejaculated and epididymal spermatozoa of domestic feline.....</b>	<b>64</b>

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO II

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>84</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>86</b>
2.1	TILÁPIA DO NILO .....	86
2.2	PRODUÇÃO .....	88
2.3	ASPECTOS REPRODUTIVOS E BIOTECNOLOGIAS APLICADAS À REPRODUÇÃO.....	89
2.4	MÉTODOS DE COLHEITA E ANÁLISE DE SÊMEN .....	90
2.5	CRIOPRESERVAÇÃO .....	93
2.6	EPIGENÉTICA.....	98
<b>3</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>101</b>
<b>4</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	<b>108</b>
<b>5.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>109</b>
5.1	OBJETIVO GERAL.....	109
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	109
<b>6</b>	<b>ARTIGO A – Influence of cryopreservation on sperm quality and epigenetics of Nile Tilapia (Oreochromis niloticus) spermatozoa</b> .....	<b>110</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS/CONCLUSÃO</b> .....	<b>134</b>
<b>8</b>	<b>DESAFIOS</b> .....	<b>135</b>

## **CAPÍTULO I**

### **RELAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA PROAKAP4 E PARÂMETROS ESPERMÁTICOS EJACULADOS E EPIDIDIMÁRIOS CRIOPRESERVADOS DE FELINOS DOMÉSTICOS (*Felis silvestris catus*)**

## 1 1 INTRODUÇÃO

2 O avanço das biotécnicas reprodutivas desempenha um papel  
3 fundamental na melhoria da qualidade reprodutiva de animais com características  
4 desejáveis em termos raciais (JOHNSON, 2018). No entanto, a pesquisa é limitada  
5 pela diversidade de espécies e pela distribuição geográfica dos animais selvagens em  
6 cativeiro, destacando a importância do gato doméstico como um modelo experimental  
7 para compreender a fisiologia reprodutiva e o uso da reprodução assistida em felídeos  
8 (PROCHOWSKA; NIZAŃSKI, 2017; PUKAZHENTHI; WILDT; HOWARD, 2001).

9 Neste contexto, a criopreservação de espermatozoides permite a  
10 conservação do gameta de animais valiosos por longos períodos e sua posterior  
11 utilização em biotécnicas de reprodução assistida (CHATDARONG, 2017). No  
12 entanto, durante o processo de criopreservação, os espermatozoides enfrentam  
13 mudanças osmóticas, choque térmico e/ou estresse oxidativo, resultando na redução  
14 de sua viabilidade e capacidade fecundante (CHEUQUEMÁN *et al.*, 2018).

15 Nos felinos domésticos, os efeitos da criopreservação dos  
16 espermatozoides são variáveis (BRUSENTSEV *et al.*, 2018; BURANAAMNUAY,  
17 2017). Este fato ocorre, principalmente, pela alta incidência de teratospermia; pois  
18 amostras espermáticas com maior porcentagem de células anormais apresentam  
19 maior suscetibilidade às crioinjúrias durante a congelação, tornando desafiador o  
20 desenvolvimento de novos protocolos para essa espécie (PUKAZHENTHI *et al.*, 1999,  
21 2006).

22 Portanto, é crucial buscar o aprimoramento dos protocolos existentes  
23 para melhorar a qualidade espermática pós-descongelação, especialmente  
24 desenvolvendo protocolos específicos para espermatozoides recuperados do  
25 epidídimo. Após a descongelação, essas células apresentam valores de motilidade,  
26 integridade da membrana plasmática e acrossomal inferiores em comparação com os  
27 espermatozoides do ejaculado (HERMANSSON; AXNÉR, 2007). A escolha do diluidor  
28 adequado, com composição iônica e pressão osmótica apropriadas, é essencial para  
29 a sobrevivência dos espermatozoides e proteção contra danos durante a  
30 criopreservação (SILVA; GUERRA, 2011). Nesse sentido, diversos diluidores  
31 comerciais estão sendo testados para otimizar os resultados da criopreservação em  
32 felinos domésticos (BRUSENTSEV *et al.*, 2018; JIMÉNEZ *et al.*, 2013; MACENTE *et*  
33 *al.*, 2012).

1 A primeira etapa da criopreservação espermática é a colheita do  
2 sêmen, que pode ser realizada por meio de eletroejaculação (EEJ), vagina artificial,  
3 cateterização uretral, lavagem vaginal pós-coito e recuperação espermática da cauda  
4 do epidídimo. A eletroejaculação é o método mais comum para felinos selvagens e a  
5 maioria dos gatos domésticos, pois não requer treinamento prévio e o animal pode ser  
6 anestesiado. No entanto, durante o procedimento, pode ocorrer contaminação por  
7 urina devido a altas voltagens, posição incorreta do eletroestimulador ou pelos  
8 anestésicos utilizados (MARTINS *et al.*, 2016; ZAMBELLI; CUNTO, 2006).

9 Como alternativa à eletroejaculação (EE), a colheita farmacológica  
10 associada ao cateterismo uretral está sendo cada vez mais adotada em estudos  
11 envolvendo felinos domésticos e selvagens (ARAUJO *et al.*, 2018; HIDALGO *et al.*,  
12 2023; LUEDERS *et al.*, 2012; SWANSON; BATEMAN; VANSANDT, 2017; ZAMBELLI  
13 *et al.*, 2008), visto que tem apresentado qualidade seminal semelhante a outras  
14 técnicas (ARAUJO *et al.*, 2018). Essa abordagem oferece diversas vantagens sobre  
15 a EE, como o uso de anestesia menos profunda, recuperação sedativa rápida e a  
16 possibilidade de reversão com antagonistas  $\alpha 2$ -adrenérgicos (ioimbina ou  
17 atipamezole). Além disso, embora o volume de sêmen recuperado seja menor, a  
18 amostra apresenta uma concentração de espermatozoides mais elevada e ausência  
19 de contaminação urinária (CARNEIRO; MOTHEO, 2023; SWANSON; BATEMAN;  
20 VANSANDT, 2017; ZAMBELLI *et al.*, 2008).

21 A recuperação espermática pela cauda do epidídimo ocorre  
22 principalmente quando se deseja preservar o material genético após a orquiectomia  
23 (MARTINS, 2007). Além disso, é de suma importância para os avanços nas pesquisas  
24 de preservação do gameta, principalmente para animais selvagens em risco de  
25 extinção, visto que é uma alternativa à conservação do material genético (LUVONI;  
26 MORSELLI, 2017). Pode ser realizado em machos que precisem ser castrados ou que  
27 venham a óbito, uma vez que os espermatozoides obtidos desta técnica continuam  
28 viáveis e mantêm a capacidade de realizar a fertilização (TSUTSUI *et al.*, 2003).

29 A avaliação *in vitro* dos espermatozoides é essencial para prever a  
30 qualidade reprodutiva do animal (BATISTA; GUERRA, 2010), permitindo estimar os  
31 danos causados aos gametas durante a criopreservação e selecionar o melhor  
32 protocolo, diluente e/ou crioprotetor para proteger as células (CARDOSO *et al.*, 2010).  
33 O sistema CASA (Computer-Assisted Semen Analysis) surgiu para uma análise mais  
34 objetiva da qualidade seminal, sendo capaz de aferir diversos parâmetros, incluindo

1 motilidade progressiva, velocidade linear das células, amplitude do deslocamento da  
2 cabeça, entre outros (FARRELL *et al.*, 1998; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2013).

3 A motilidade espermática é a característica mais importante na  
4 predição do potencial de fertilidade, pois é requisito básico para que o gameta alcance  
5 o oócito e consiga fertiliza-lo (ARRUDA *et al.*, 2011). Além disso, este parâmetro, é o  
6 mais afetado dentro do processo de congelação e descongelação da amostra, o que  
7 torna essa avaliação fundamental na escolha do melhor protocolo de criopreservação  
8 (CHEUQUEMÁN *et al.*, 2018). Embora a cinética espermática esteja relacionada à  
9 capacidade de fertilização dos espermatozoides, somente estes parâmetros não são  
10 acurados o suficiente para prever a capacidade fecundante do sêmen, sendo de  
11 grande valia, técnicas de avaliação de proteínas relacionadas à fertilidade (GLIOZZI  
12 *et al.*, 2017; JANUSKAUSKAS; JOHANNISSON; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003).

13 Em função das questões levantadas, estudos têm se dedicado à  
14 identificação de biomarcadores espermáticos que possam estar diretamente  
15 correlacionados com as taxas de fertilidade (SERGEANT *et al.*, 2019). Assim, a  
16 investigação das proteínas constituintes do espermatozoide e aquelas presentes no  
17 plasma seminal pode fornecer novas percepções sobre a fisiologia espermática,  
18 potencialmente se tornando marcadores de fertilidade em machos (CODINA *et al.*,  
19 2015).

20 A proteína AKAP4 (proteína ancoradora da quinase-4) e seu  
21 precursor, proAKAP4, têm recebido destaque como possíveis biomarcadores  
22 proteicos (BLOMMAERT *et al.*, 2018; DELEHEDDE *et al.*, 2019b). Essa proteína  
23 desempenha um papel estrutural no flagelo espermático e está intimamente envolvida  
24 na motilidade espermática (SERGEANT *et al.*, 2019). Entretanto, não foram  
25 encontrados na literatura estudos em que os parâmetros de fertilidade tenham sido  
26 associados a presença dessa proteína na espécie felina.

27 Com base nos aspectos mencionados acima, este estudo surge como  
28 um avanço para novas pesquisas que podem vir a ser utilizadas como biomarcadores  
29 da eficiência reprodutiva do felídeo.

## 1 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2 2.1 ASPECTOS REPRODUTIVOS DO GATO DOMÉSTICO

3 No gato doméstico, o sistema reprodutor compreende um par de  
4 testículos, um sistema de ductos (epidídimos, ductos deferentes e uretra), próstata,  
5 glândulas bulbouretrais, pênis e escroto (DAVIDSON; BAKER, 2009; JOHNSON,  
6 2022).

7 Os testículos, de formato ovalado, estão situados na região perineal,  
8 dentro de um escroto fino ventral ao ânus. Esses órgãos são responsáveis pela  
9 produção do gameta masculino (espermatogênese) e síntese de hormônios  
10 esteroides. Revestidos pelas túnicas vaginais visceral e parietal, além da túnica  
11 albugínea, os testículos dividem-se em região mediastinal e lobular (JOHNSON,  
12 2022). Os lobos contêm os túbulos seminíferos, que ocupam cerca de 90% do espaço  
13 testicular e são o local da espermatogênese (AXNÉR, 2008; GOBELLO, 2022). Na  
14 região intersticial, ocorre a produção de testosterona (ZHOU *et al.*, 2019).

15 A espermatogênese tem início aproximadamente aos seis meses de  
16 idade, quando os túbulos seminíferos apresentam um epitélio germinativo  
17 diferenciado e o tecido intersticial se torna mais espaçado. O pico reprodutivo ocorre  
18 aos 12 meses, com maior diferenciação do epitélio seminífero e atividade  
19 espermatogênica, resultando em uma maior produção espermática,  
20 aproximadamente 16 milhões de espermatozoides/dia/testículo em comparação com  
21 fases anteriores (TSUTSUI *et al.*, 2003).

22 Após a produção dos gametas, estes são transportados até o  
23 epidídimo, uma estrutura tubular extragonadal adjacente ao testículo, pela rede  
24 testicular. O epidídimo possui três regiões distintas: cabeça, corpo e cauda, cada uma  
25 revestida por um tipo de epitélio diferente. No epidídimo é que os espermatozoides  
26 passam pelo processo de maturação, tornando-se móveis e aptos à fertilização, e  
27 onde ocorre a compactação do material genético pela substituição das histonas por  
28 protaminas (SRINGAM *et al.*, 2011).

29 Os espermatozoides maturados são armazenados na porção da  
30 cauda do epidídimo até a ejaculação, quando são liberados no ducto deferente e  
31 direcionados à uretra para saída para o meio externo. Ao alcançarem a uretra, os

1 espermatozoides entram em contato com os fluidos produzidos pelas glândulas  
2 acessórias (próstata e bulbouretrais), que os protegem e contribuem para aumentar o  
3 volume do ejaculado (DAVIDSON; BAKER, 2009).

4 As amostras de sêmen felino, tanto do ejaculado quanto do epidídimo,  
5 podem apresentar uma alta proporção de células anormais, teratospermia.  
6 Aparentemente, essa condição está relacionada à baixa variabilidade genética dos  
7 indivíduos e a fatores ambientais. Alterações no equilíbrio hormonal intratesticular de  
8 testosterona e estradiol também podem influenciar a teratospermia e afetar  
9 negativamente a eficiência espermatogênica (FILLIERS *et al.*, 2010; MÜLLER *et al.*,  
10 2012).

11 As principais alterações morfológicas encontradas nos  
12 espermatozoides felinos incluem peça intermediária dobrada, cauda dobrada ou  
13 fortemente enrolada, cabeça solta e defeitos no acrossoma. Além disso, os  
14 espermatozoides do epidídimo podem apresentar uma maior proporção de gota  
15 citoplasmática distal, remanescente do processo de maturação espermática  
16 (ANGRIMANI *et al.*, 2017).

17 Até o momento, não está claro como a teratozoospermia pode afetar  
18 a reprodução dos felinos, uma vez que machos teratospérmicos são capazes de  
19 produzir ninhadas (AXNÉR; FORSBERG, 2007). No entanto, a teratozoospermia  
20 representa um desafio para a eficácia das biotécnicas aplicadas à reprodução na  
21 espécie, especialmente na criopreservação, pois os espermatozoides  
22 morfológicamente anormais são mais sensíveis aos danos causados pelo processo  
23 de criopreservação (PUKAZHENTHI *et al.*, 1999, 2006).

## 24 2.2 IMPORTÂNCIA DA CONSERVAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES DE GATOS DOMÉSTICOS

25 De acordo com a União Internacional para a Conservação da  
26 Natureza (IUCN), a maioria das populações globais de felinos está em declínio em  
27 seus habitats naturais, com cerca de metade delas classificadas como ameaçadas de  
28 acordo com a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas (IUCN, 2021).

29 A literatura reporta que a maioria das 37 espécies da família *Felidae*  
30 enfrenta ameaças de extinção, com exceção dos gatos domésticos (*Felis catus*). No  
31 entanto, os gatos selvagens estão em categorias variadas de ameaça, como  
32 ameaçados, vulneráveis ou em perigo, devido à caça predatória e à destruição do

1 habitat (ANDREWS *et al.*, 2019). Tanto os gatos selvagens quanto os domésticos  
2 desempenham papéis importantes como modelos de pesquisa para entender os  
3 processos biológicos que influenciam o sucesso reprodutivo nas diferentes espécies  
4 de *Felidae* (JEWGENOW *et al.*, 2009).

5 Uma técnica essencial para preservar as populações de gatos  
6 selvagens e domésticos é o uso de biotécnicas reprodutivas (THONGPHAKDEE *et*  
7 *al.*, 2020). A criopreservação, que permite a preservação de células e tecidos de  
8 felídeos selvagens a longo prazo por meio de temperaturas abaixo de zero, é uma  
9 técnica útil para os esforços de conservação (YONG *et al.*, 2017). A criopreservação  
10 de sêmen oferece a vantagem de transferir material genético entre locais distantes,  
11 garantindo a diversidade genética, mesmo se os animais morrerem sem se reproduzir  
12 (VANSANDT *et al.*, 2021).

13 Os métodos de criopreservação de sêmen em gatos domésticos têm  
14 sido menos eficazes em comparação com outras espécies de mamíferos domésticos  
15 (SWANSON; BATEMAN; VANSANDT, 2017). Assim, estudos reprodutivos na espécie  
16 felina permitem obtenção de informações sobre as características e o comportamento  
17 das células espermáticas frente às condições estressantes da criopreservação e  
18 assim, auxiliam na criação de protocolos eficientes e potencialmente aplicáveis aos  
19 demais felinos; embora, diferenças entre a biologia reprodutiva dos felídeos devam  
20 ser consideradas antes da extrapolação dos protocolos experimentais  
21 (CHATDARONG, 2017).

22 O estabelecimento de um criobanco é essencial para a manutenção  
23 da biodiversidade, servindo como uma rede de segurança, caso outros esforços de  
24 conservação falhem (BARBOSA *et al.*, 2020). Além disso, o sêmen criopreservado  
25 pode ser uma alternativa à importação de animais de países estrangeiros, o que pode  
26 melhorar os programas de manejo global e promover a diversidade genética entre  
27 felinos em zoológicos e selvagens (WILDT *et al.*, 1997).

## 28 2.3 MÉTODOS DE COLHEITA ESPERMÁTICA

29 Nas últimas décadas, houve um aumento notável no interesse pela  
30 colheita e avaliação seminal de felinos. Gatos domésticos têm assumido um  
31 importante papel como modelos experimentais para o avanço e o aprimoramento das  
32 biotecnologias reprodutivas, direcionados principalmente para os exemplares de

1 felinos selvagens (CARNEIRO; MOTHEO, 2023; FRANKLIN; WADDELL;  
2 GOODROWE, 2018; MARTINS; ALMEIDA; HIDALGO, 2022).

3 Os métodos de colheita de sêmen em felinos são diversos e altamente  
4 dependentes das competências do técnico, de materiais disponíveis e das  
5 características comportamentais do macho (CARNEIRO; MOTHEO, 2023). Ademais,  
6 nesta espécie, a colheita apresenta muitos desafios, uma vez que o volume do  
7 ejaculado é baixo e a amostra colhida precisa ser suficientemente preservada para a  
8 análise espermática, inseminação ou criopreservação (JOHNSON, 2018).

9 Diferentes métodos de colheita espermática são descritos, como:  
10 eletroejaculação (SOUZA *et al.*, 2018), vagina artificial (VILLAYERDE *et al.*, 2013),  
11 ejaculação farmacológica (HIDALGO *et al.*, 2023) e colheita dos espermatozoides da  
12 cauda do epidídimo (TOYONAGA; TSUTSUI, 2012).

### 13 2.3.1 Eletroejaculação

14 Para a realização da técnica de eletroejaculação (EE), diferentes  
15 protocolos de estímulos elétricos têm sido reportados (HOWARD, 1993; MARTINS  
16 *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2018; WILDT DE *et al.*, 1983), no entanto, o mais utilizado  
17 consiste na aplicação de três séries de estímulos (30, 30, 20) de 2 a 6 volts, com  
18 intervalo de cinco minutos entre as séries (HOWARD, 1993). Uma variação de  
19 protocolo de eletroejaculação foi descrita por Martins e colaboradores (2016), em que  
20 80 estímulos foram aplicados em 3 séries (30, 30, 20) de 2 a 3 volts, com descanso  
21 de cinco minutos entre as séries. Este protocolo demonstrou eficiência na colheita de  
22 sêmen em pequenos e grandes felinos selvagens utilizando estímulos de baixas  
23 voltagens, com a vantagem de diminuir o risco de contaminação por urina.

24 É importante ressaltar que, apesar de apresentar algumas vantagens  
25 como, obtenção de sêmen de animais agressivos, que não respondem bem ao  
26 treinamento com vagina artificial ou que possuem problemas de libido, a técnica  
27 possui algumas desvantagens como, necessidade de submeter o animal à anestesia  
28 geral, custo do equipamento, contaminação da amostra com urina, retroejaculação e  
29 treinamento da equipe (JOHNSON, 2018; MARTINS; JUSTINO, 2015).

### 30 2.3.2 Vagina Artificial

31 A colheita do sêmen com vagina artificial possui vantagens: tem baixo

1 custo, pode ser realizada em um macho não anestesiado e permite que a ejaculação  
2 seja completa (JOHNSON, 2018). No entanto, para a utilização dessa técnica é  
3 necessário um período de treinamento do animal de duas a três semanas, e, em  
4 alguns casos, até meses para que o animal se condicione e consiga produzir  
5 ejaculados completos de boa qualidade, e ainda assim, pode não ocorrer com todos  
6 os machos (ACKERMANN; LOPES, 2020; JOHNSON, 2018). Geralmente, são  
7 utilizadas fêmeas no estro, mas o macho também pode ser treinado com uma gata  
8 submissa, castrada ou não, que aceite a monta, ou com um manequim de pelúcia  
9 (MARTINS e JUSTINO, 2015).

### 10 2.3.3 Ejaculação farmacológica

11 Como alternativa à EE, a colheita farmacológica associada ao  
12 cateterismo uretral está sendo cada vez mais empregada nos estudos desenvolvidos  
13 com felinos domésticos e selvagens (HIDALGO et al., 2023; ARAUJO *et al.*, 2018;  
14 LUEDERS *et al.*, 2012; SWANSON; BATEMAN; VANSANDT, 2017; ZAMBELLI *et al.*,  
15 2008), visto que tem apresentado qualidade seminal semelhante a outras técnicas  
16 (ARAUJO *et al.*, 2018). Essa técnica oferece diversas vantagens sobre a EE, incluindo  
17 a utilização de anestesia menos profunda, rápida recuperação sedativa e  
18 possibilidade de reversão com antagonistas  $\alpha 2$ -adrenérgicos (ioimbina ou  
19 atipamezole). Além disso, apesar do menor volume de sêmen recuperado, a amostra  
20 possui maior concentração de espermatozoides e ausência de contaminação urinária  
21 (CARNEIRO; MOTHEO, 2023; FRANKLIN; WADDELL; GOODROWE, 2018;  
22 SWANSON; BATEMAN; VANSANDT, 2017; ZAMBELLI *et al.*, 2008). Notavelmente,  
23 a diminuição do volume do plasma seminal elimina a necessidade de centrifugação  
24 da amostra, tornando-a particularmente vantajosa quando se trabalha com animais de  
25 vida livre (FRANKLIN; WADDELL; GOODROWE, 2018; SWANSON; BATEMAN;  
26 VANSANDT, 2017; ZAMBELLI *et al.*, 2008).

27 O princípio da ejaculação farmacológica envolve a administração de  
28 fármacos agonistas  $\alpha 2$ -adrenérgicos seletivos, que promovem a contração da  
29 musculatura lisa do ducto deferente e conseqüente liberação de sêmen pela uretra. O  
30 sêmen é recuperado por capilaridade usando um cateter uretral semirrígido tipo  
31 *Tomcat* com extremidade aberta. Essa abordagem exclui a necessidade de cateteres  
32 com aberturas laterais e garante uma colheita de sêmen eficiente e confiável  
33 (HIDALGO *et al.*, 2023; MADRIGAL-VALVERDE *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2022;

1 ZAMBELLI *et al.*, 2008, 2010).

2           Dentre os fármacos agonistas  $\alpha$ 2-adrenérgicos, estudos reportam o  
3 uso de detomidina, xilazina, medetomidina e dexmedetomidina, sendo que os dois  
4 últimos apresentam os melhores resultados (SILVA *et al.*, 2022; SWANSON;  
5 BATEMAN; VANSANDT, 2017; ZAMBELLI *et al.*, 2008). A medetomidina é conhecida  
6 por ser um potente agonista  $\alpha$ 2-adrenérgico que promove sedação, analgesia e  
7 relaxamento muscular (DUQUE *et al.*, 2013; NASRALLAH *et al.*, 2014). Possui alta  
8 relação de seletividade  $\alpha$ 2/ $\alpha$ 1 de 1620/1, o que o torna 6,2 vezes mais seletivo para  
9 receptores  $\alpha$ 2-adrenérgicos do que a detomidina e dez vezes mais seletivo que a  
10 xilazina (VIRTANEN *et al.*, 1988). No entanto, seu uso em altas doses, pode aumentar  
11 os riscos dos efeitos colaterais no sistema cardiovascular, podendo inviabilizar seu  
12 uso em alguns animais (ROMAGNOLI *et al.*, 2015). A dexmedetomidina, por outro  
13 lado, é o enantiômero dextrogiro da medetomidina, que possui a mesma taxa de  
14 seletividade para receptores  $\alpha$ 2-adrenérgicos e baixa afinidade para receptores  $\beta$ -  
15 adrenérgicos, muscarínicos, dopaminérgicos, serotoninérgicos, opióides e de ácido  $\gamma$ -  
16 aminobutírico (GABA). Como resultado, requer uma dosagem menor, reduzindo assim  
17 os efeitos colaterais indesejáveis, (GERRESHEIM; SCHWEMMER, 2013; JULIÃO;  
18 ABIMUSSI, 2019), avançando como um fármaco mais seguro (SWANSON;  
19 BATEMAN; VANSANDT, 2017).

#### 20 2.3.4 Recuperação espermática da cauda do epidídimo

21           A recuperação espermática da cauda do epidídimo ocorre quando se  
22 deseja preservar o material genético de animais que vieram a óbito, ou mesmo, sejam  
23 acometidos de alguma afecção que comprometa sua capacidade reprodutiva. Essa  
24 biotecnologia é de suma importância para os avanços nas pesquisas de preservação  
25 do gameta, principalmente para animais selvagens em risco de extinção, visto que  
26 permite o transporte e o armazenamento dos complexos testículos-epidídimos  
27 (CTE's) do animal *pos-mortem* por até 48 horas sob refrigeração (4-5 °C), até centros  
28 de pesquisas, o que aumenta a possibilidade da recuperação de espermatozoides  
29 viáveis e da sua posterior aplicação em programas de reprodução assistida  
30 (ANGRIMANI *et al.*, 2018; BARBOSA *et al.*, 2020; LUVONI; MORSELLI, 2017).

31           A obtenção dos espermatozoides pode ser realizada por diversas

1 abordagens. Na técnica de flutuação, o epidídimo é seccionado, em contato com o  
2 meio de recuperação, e os fragmentos são mantidos em repouso para favorecer a  
3 migração dos espermatozoides para o meio (LIMA e SILVA, 2017). No fatiamento  
4 (*Slicing*), técnica semelhante à anterior, a cauda do epidídimo é fragmentada e  
5 comprimida simultaneamente com auxílio de pinças e/ou agulhas hemostáticas,  
6 promovendo o extravasamento do fluido epididimário para o exterior (MOREIRA,  
7 2017). Outra possibilidade é a realização do fluxo retrógrado, no qual uma agulha ou  
8 cateter é inserido no canal deferente e um meio de recuperação é utilizado para lavar  
9 o conteúdo da cauda do epidídimo em um tubo plástico ou placa de petri (ANGRIMANI  
10 *et al.*, 2013). Ademais, uma outra alternativa para obtenção dos espermatozoides é a  
11 técnica de compressão da cauda do epidídimo e ducto deferente, em que o epidídimo  
12 e o ducto deferente são ordenhados com auxílio de pinças hemostáticas, sem que  
13 haja dissecação da estrutura e a amostra é recuperada em placa de petri (CATARDO;  
14 SCOLARI; MÁS-ROSA, 2018).

## 15 2.4 ANÁLISE ESPERMÁTICA

16 A avaliação *in vitro* dos espermatozoides desempenha um papel  
17 fundamental na predição da qualidade reprodutiva do animal (ZAMBELLI; CUNTO,  
18 2006). Isso permite, ao implementar as biotecnologias reprodutivas, garantir a  
19 qualidade da amostra fresca e estimar os danos aos gametas durante as etapas de  
20 criopreservação, permitindo a seleção do protocolo, diluente e/ou crioprotetor que  
21 ofereça melhor proteção à célula (CARDOSO *et al.*, 2010). Nesse sentido, a qualidade  
22 de uma amostra espermática é baseada em análises macroscópicas como: volume,  
23 cor e odor e análises microscópicas como: cinética, concentração, morfologia,  
24 viabilidade (JOHNSON, 2022; ZAMBELLI; CUNTO, 2006). Portanto, é recomendado  
25 o uso complementar desses testes para uma análise seminal mais precisa.

### 26 2.4.1 Morfologia e integridade de membrana plasmática

27 A morfologia espermática, é o parâmetro que reflete mais  
28 significativamente na fecundação, pois está intimamente relacionada às  
29 características genéticas do animal e o potencial de fertilidade (ARRUDA *et al.*, 2015;  
30 DOS SANTOS *et al.*, 2016). Além disso, já foi descrito correlação positiva entre a

1 morfologia e a motilidade espermática (AGARWAL; SHARMA; NELSON, 2003).

2 Uma particularidade relacionada a espécie é que o gato doméstico,  
3 frequentemente, apresenta teratozoospermia, caracterizada pela presença de mais de  
4 60% de células anatomicamente malformadas no ejaculado, e uma redução na  
5 qualidade do sêmen fora da estação reprodutiva (PROCHOWSKA; PARTYKA;  
6 NIŻAŃSKI, 2021). O espermatozoide normalmente possui a cauda longa, a peça  
7 intermediária proeminente e a cabeça oval. Os defeitos mais comuns incluem cabeças  
8 e peças intermediárias malformadas, além de caudas bem enroladas, indicativas de  
9 uma produção inadequada de espermatozoides dentro do testículo (JOHNSON,  
10 2022).

11 Na morfologia espermática, a célula é examinada quanto o formato da  
12 sua cabeça, peça intermediária e cauda, a partir de esfregaços corados (corantes:  
13 Rosa Bengala, Giemsa, Eosina-nigrosina, Karras, Papanicolau) em microscópio  
14 óptico, ou usando de câmara úmida em microscopia de contraste de interferência  
15 diferencial (DIC) (ARRUDA *et al.*, 2015, 2011). A estimativa de alterações  
16 morfológicas deve ser realizada em 200 células, apesar de já ter sido relatado que a  
17 leitura de 100 células se mostraram confiáveis e suficientes para representar a  
18 amostra do ejaculado (HIDALGO *et al.*, 2005; HIDALGO; RODRÍGUEZ; DORADO,  
19 2006). Os defeitos morfológicos dos espermatozoides são classificados em maiores  
20 e menores, podendo afetar a cabeça, o corpo ou a cauda do espermatozoide. Esses  
21 defeitos são categorizados com base em seu potencial prejudicial para a célula  
22 espermática. Os defeitos maiores incluem anormalidades na cabeça, onde está  
23 localizado o material genético; na peça intermediária, responsável por fornecer  
24 energia à célula espermática; e na cauda, o que compromete a motilidade espermática  
25 (CBRA, 2013).

26 Assim como a morfologia espermática, outro parâmetro a ser  
27 considerado na avaliação da fertilidade do macho é a viabilidade do espermatozoide  
28 (PINTADO; DE LA FUENTE; ROLDAN, 2000) A membrana plasmática tem papel  
29 fundamental em diversos processos fisiológicos da célula espermática, como  
30 preservação da homeostase celular (DE ANDRADE *et al.*, 2007), capacitação  
31 espermática (HALLAP *et al.*, 2006), da apoptose celular (DURU *et al.*, 2001) e  
32 fecundação, ao interagir com epitélio do trato reprodutivo feminino e com as células  
33 do complexo *cumulus oophorus* (HOSSAIN *et al.*, 2011). Desta forma, a avaliação da  
34 integridade de membrana é considerada como reflexo da viabilidade celular e está

1 envolvida diretamente com a capacidade fecundante do espermatozoide (HALLAP *et*  
2 *al.*, 2006; NARESH; ATREJA, 2015).

3 Existem várias maneiras de avaliar a integridade da membrana  
4 plasmática. Isso inclui o uso de sondas fluorescentes impermeáveis à membrana  
5 íntegra, que se ligam ao DNA quando há lesões na membrana, permitindo a  
6 identificação de espermatozoides com alterações (PEÑA *et al.*, 2003), teste  
7 hiposmótico (ARRUDA *et al.*, 2011) e a dupla coloração com eosina/nigrosina. No  
8 teste de eosina/nigrosina, a eosina cora de rosa os espermatozoides com membranas  
9 lesadas, enquanto a nigrosina proporciona um contraste mais escuro, permitindo a  
10 visualização dos espermatozoides não corados. Portanto, esse teste é recomendado  
11 como uma avaliação complementar às análises de rotina (BRITO, 2007).

12 Embora a identificação de espermatozoides com defeitos na  
13 morfologia e membrana plasmática seja possível por meio de microscopia óptica, a  
14 observação de outros elementos morfofuncionais, como a cinética espermática,  
15 requer o emprego de métodos mais objetivos, como o sistema CASA, que podem  
16 correlacionar com maior precisão esses parâmetros de fertilidade.

#### 17 2.4.2 Cinética espermática

18 Os espermatozoides devem ser progressivamente móveis para  
19 alcançar e fertilizar o óvulo/oócito; por esse motivo, a motilidade espermática é um  
20 fator primordial durante a concepção natural e assistida (DCUNHA *et al.*, 2022). Está  
21 bem estabelecido que a motilidade dos espermatozoides está fortemente  
22 correlacionada ao sucesso da fertilização *in vitro* e ao resultado de prenhez (HENKEL  
23 *et al.*, 2005). A motilidade dos espermatozoides depende da forma e função dos  
24 flagelos, e diversos estudos associam a baixa motilidade à falhas genéticas (GUPTA  
25 *et al.*, 2012).

26 Inicialmente, a avaliação do movimento espermático era realizada de  
27 forma subjetiva, com a motilidade sendo classificada em porcentagem e o vigor  
28 avaliado em uma escala de 0 a 5 (CBRA, 2013; HOLT; CUMMINS; SOLER, 2018).  
29 Para superar os possíveis erros causados pela subjetividade na análise da cinética  
30 espermática em microscopia óptica, adotou-se o uso da técnica computadorizada  
31 (BERGSTEIN; WEISS; BICUDO, 2014; KATHIRAVAN *et al.*, 2011; SIMONIK *et al.*,  
32 2015).

1 O sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis) consiste em  
2 uma câmera acoplada a um microscópio de contraste de fase. As imagens capturadas  
3 são enviadas a um computador com um *software* especializado, capaz de avaliar em  
4 tempo real a trajetória dos espermatozoides (HOLT; CUMMINS; SOLER, 2018;  
5 KATHIRAVAN *et al.*, 2011). Esse *software* reconstrói a trajetória de cada célula  
6 analisada com base em uma sequência de fotos tiradas a cada segundo do campo  
7 selecionado durante a digitalização das cabeças dos espermatozoides. No entanto, é  
8 importante ressaltar que a precisão da avaliação pelo sistema CASA depende da  
9 experiência do operador e da adequação do *setup* para cada espécie (KATHIRAVAN  
10 *et al.*, 2011; SINGH; KUMAR; BISLA, 2021; YÁNIZ *et al.*, 2018).

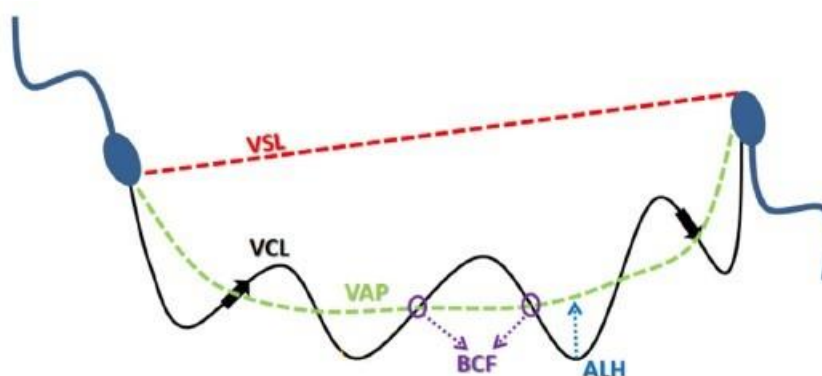
11 Apesar do sistema CASA fornecer dados confiáveis sobre a  
12 motilidade dos espermatozoides, vários fatores podem gerar variabilidade na  
13 estimativa dos parâmetros funcionais dos espermatozoides, entre eles: experiência do  
14 observador, identificação da espécie, tipo da câmara utilizada, temperatura de análise,  
15 tempo entre a colheita da amostra e sua análise, frequência de aquisição de imagens  
16 (KATHIRAVAN *et al.*, 2011; MORTIMER; MENKVELD, 2001) e concentração  
17 espermática (SCHNITZER *et al.*, 2019). Além disso, a falta de padronização dos  
18 *setups*, ausência de calibragem para sêmen de animais de raças diferentes e  
19 preparação da amostra (BOMPART *et al.*, 2019), pode prejudicar a comparação entre  
20 diferentes sistemas e laboratórios (KATHIRAVAN *et al.*, 2011; SIMONIK *et al.*, 2015).  
21 Para os felinos, poucos são os trabalhos que documentam a configuração do sistema  
22 CASA na espécie (FILLIERS *et al.*, 2008; VILLAVERDE *et al.*, 2009).

23 Os principais parâmetros analisados pelo sistema CASA incluem:  
24 motilidade total (TM-%), que afere a quantidade de espermatozoides móveis;  
25 motilidade progressiva (PM-%), fornece a quantidade de espermatozoides móveis  
26 com trajetória em linha reta; velocidade de trajeto (VAP- $\mu\text{m/s}$ ), mostra a velocidade da  
27 trajetória média dos espermatozoides; velocidade progressiva (VSL- $\mu\text{m/s}$ ), aponta a  
28 distância entre início e fim da trajetória dividida pelo tempo decorrido; velocidade  
29 curvilínea (VCL- $\mu\text{m/s}$ ), apresenta a velocidade da trajetória do espermatozoide;  
30 amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH- $\mu\text{m}$ ), remete à largura média da  
31 oscilação da cabeça do espermatozoide durante seu deslocamento; frequência de  
32 batimentos cruzados flagelares (BCF-Hz), aponta a frequência com que a linha da  
33 cabeça espermática atravessa a trajetória celular; retilinearidade (STR-%), resulta da  
34 relação entre VSL e VAP; linearidade (LIN-%) é a razão entre VSL e VCL

1 (BERGSTEIN; WEISS; BICUDO, 2014; SIMONIK *et al.*, 2015) (Figura 1).

2

3 **Figura 1.** Representação gráfica da trajetória de um espermatozoide avaliado pelo  
4 Sistema CASA



5

6 VAP ( $\mu\text{m/s}$ ): velocidade da trajetória média dos espermatozoides; VSL ( $\mu\text{m/s}$ ): distância entre início e  
7 fim da trajetória dividida pelo tempo decorrido; VCL ( $\mu\text{m/s}$ ): velocidade da trajetória do espermatozoide;  
8 ALH ( $\mu\text{m}$ ): largura média da oscilação da cabeça do espermatozoide durante seu deslocamento  
9 Fonte: KOVALSKI; CEJKO (2019).

10

11 Pesquisas indicam que a associação de técnicas resulta em uma  
12 avaliação mais precisa da fertilidade espermática (GLIOZZI *et al.*, 2017; SIMONIK *et*  
13 *al.*, 2015). Ressalta-se que apenas a utilização de métodos de avaliação  
14 convencionais nem sempre é capaz de prever com precisão a fertilidade do animal.  
15 Nesse sentido, métodos de análise molecular do sêmen, como o estudo das proteínas  
16 espermáticas, têm sido associados a taxas de fertilidade, oferecendo uma  
17 contribuição valiosa na seleção de animais para aplicação em biotecnologias  
18 reprodutivas (SERGEANT *et al.*, 2019).

### 19 2.4.3 A ProAKAP4 como biomarcador da qualidade espermática

20 As análises convencionais de sêmen são comumente usadas para  
21 avaliar a fertilidade do macho. No entanto, o sucesso da fertilização não pode ser  
22 atribuído apenas ao número absoluto de espermatozoides viáveis, móveis ou  
23 morfológicamente normais, mas depende mais da competência funcional do  
24 espermatozoide (CARRACEDO *et al.*, 2022; PROCHOWSKA; EBERHARDT;  
25 NIŻAŃSKI, 2024; SERGEANT *et al.*, 2019).

26 Ao longo dos anos, a pesquisa proteômica forneceu novas  
27 percepções sobre processos específicos do espermatozoide para avaliar com mais

1 precisão a fertilidade masculina. A ausência ou expressão anormal de proteínas  
2 essenciais do espermatozoide também demonstrou contribuir para casos de  
3 infertilidade (DELEHEDDE *et al.*, 2019a; KUMAR; SINGH, 2021). Foram identificados  
4 muitos biomarcadores proteicos que podem ajudar a diferenciar entre baixa e  
5 alta qualidade do sêmen e, conseqüentemente, entre indivíduos inférteis e férteis  
6 (GRIFFIN *et al.*, 2020; JUMEAU *et al.*, 2018; KUMAR; SINGH, 2021; SERGEANT *et*  
7 *al.*, 2019).

8           As proteínas ancoradoras da quinase (AKAPs) desempenham um  
9 papel crucial na regulação da gametogênese, tanto no sistema reprodutor masculino  
10 quanto no feminino (JUMEAU *et al.*, 2018; LUCONI *et al.*, 2011). Estudos  
11 demonstraram que a AKAP3 é localizada em espermátides ainda em estágio  
12 arredondado, enquanto a AKAP4 e sua precursora são detectadas em espermátides  
13 alongadas (JUMEAU *et al.*, 2018; MORETTI *et al.*, 2007). A AKAP4, codificada por um  
14 gene ligado ao cromossomo X e de herança total materna, é essencial para a  
15 formação adequada dos espermatozoides. Problemas na transmissão desse gene  
16 podem resultar em deficiência da proteína, afetando a fertilidade (TURNER *et al.*,  
17 1999).

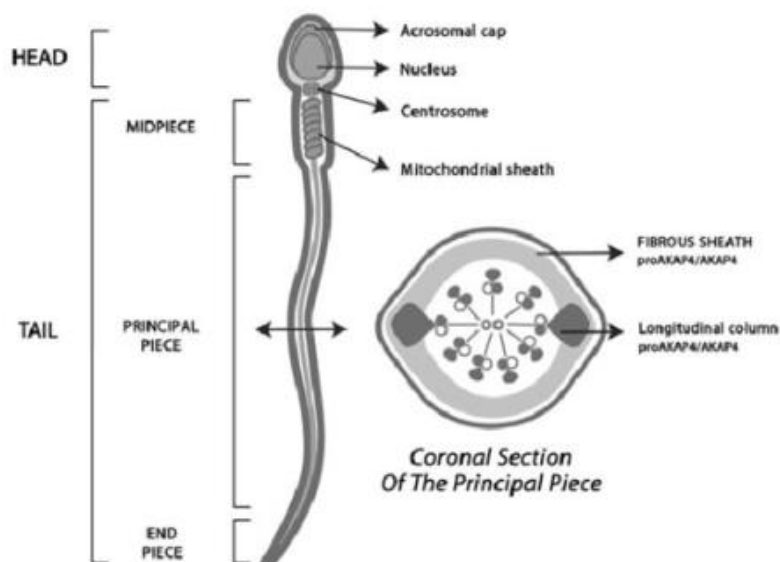
18           A proteína AKAP4 (proteína de ancoragem da A-quinase 4) e seu  
19 precursor, proAKAP4 se destaca como a principal proteína estrutural e funcional da  
20 bainha fibrosa do espermatozoide e está localizada na peça principal do flagelo  
21 (CARRACEDO *et al.*, 2022; DELEHEDDE *et al.*, 2019a; DORDAS-PERPINYÀ *et al.*,  
22 2022b; SERGEANT *et al.*, 2019), não localizada no plasma seminal (DELEHEDDE *et*  
23 *al.*, 2018). A bainha fibrosa influencia o grau de flexibilidade, o plano de movimento  
24 flagelar e a forma do batimento flagelar (VIJAYARAGHAVAN *et al.*, 1999). A proteína  
25 AKAP4 é expressa em diversas espécies animais, de lagartos a mamíferos e sua  
26 sequência genética é altamente conservada (com homologia geral de 70%),  
27 destacando seu importante papel no espermatozoide (CARRACEDO *et al.*, 2022).  
28 Esta proteína de estrutura é fundamental na regulação do movimento do flagelo do  
29 espermatozoide e uma deleção de AKAP4, como descrito em camundongos machos  
30 *knockout* para AKAP4, resulta em uma formação defeituosa da bainha fibrosa e  
31 displasia flagelar, resultando em infertilidade devido à perda de motilidade e  
32 anormalidades espermáticas (FANG *et al.*, 2019; MIKI *et al.*, 2002) (Figura 2).

33           AKAP4 é codificado e traduzido como um polipeptídeo precursor,  
34 proAKAP4, que deve ser clivado por proteólise em uma forma madura (CARRACEDO

1 *et al.*, 2022). Devido ao fato de os espermatozoides apresentarem transcrição inativa,  
 2 toda a AKAP4 é produzida durante a espermatogênese. Nesse contexto, o polipeptídeo  
 3 proAKAP4 funciona como uma forma de armazenamento da AKAP4, embora somente  
 4 esta última tenha potencial de atividade celular. Portanto, a concentração de AKAP4  
 5 é modulada pelo estoque do precursor proAKAP4 presente no espermatozoide, e a  
 6 conversão de proAKAP4 em AKAP4 ocorre apenas em espermatozoides vivos e  
 7 móveis. Essa regulação é fundamental para garantir a funcionalidade adequada dos  
 8 espermatozoides durante o processo de fertilização (DELEHEDDE *et al.*, 2019b;  
 9 JUMEAU *et al.*, 2018; SERGEANT *et al.*, 2019).

10

11 **Figura 2.** Representação gráfica da expressão da proAKAP4 no espermatozoide



12

13 Fonte: DELEHEDDE *et al.* (2020).

14

15 Por se tratar de um biomarcador extremamente conservado nos  
 16 espermatozoides mamíferos (SERGEANT *et al.*, 2019), a proAKAP4 já foi mensurada  
 17 em inúmeras espécies como indicador de qualidade e fertilidade. As concentrações  
 18 de proAKAP4 foram correlacionadas com a motilidade total e progressiva em  
 19 garanhões (BLOMMAERT *et al.*, 2019; DORDAS-PERPINYÀ *et al.*, 2022b), touros  
 20 (ALMEIDA *et al.*, 2022; DORDAS-PERPINYÀ *et al.*, 2022), cães (LE COUAZER *et al.*,  
 21 2019), carneiros (RIESCO *et al.*, 2020) e camelos (MALO *et al.*, 2021).

22

Em estudos realizados com espermatozoides humanos, foi observado

1 que a quantidade de proAKAP4 apresenta correlação positiva com a motilidade  
2 espermática apenas após o teste de gradiente de densidade e separação do plasma  
3 seminal. Além disso, foi reportado que a AKAP4 pode ser ativada para resgatar a  
4 motilidade espermática após centrifugação, demonstrando mais uma vez o papel da  
5 sua precursora como reserva proteica (JUMEAU *et al.*, 2018). Em indivíduos do sexo  
6 masculino que são fumantes, foi identificada menor quantidade de proAKAP4 no  
7 sêmen, o que está associado a redução na qualidade do sêmen (DELEHEDDE *et al.*,  
8 2019b).

9                   Em amostras de sêmen equino, foi encontrada correlação positiva  
10 entre a concentração de proAKAP4 e a motilidade total e progressiva (BLOMMAERT  
11 *et al.*, 2018). Em espermatozoides ovinos, foram detectadas relações positivas com a  
12 motilidade total, progressiva e a viabilidade espermática, além de correlação negativa  
13 entre a proAKAP4 e a taxa de apoptose espermática (RIESCO *et al.*, 2020).

14                   No contexto da avaliação da proAKAP4 em sêmen bovino, um estudo  
15 indicou que os níveis de proAKAP4 foram positivamente correlacionados com TM, PM  
16 e células rápidas. Além disso, a concentração de proAKAP4 foi um parâmetro que  
17 influenciou a taxa de concepção (ALMEIDA *et al.*, 2022). Outro estudo apoiou esses  
18 achados, mostrando a correlação do proAKAP4 com a cinética espermática e  
19 estabelecendo uma relação entre os níveis de proAKAP4 e as taxas de não retorno  
20 ao estro (considerando 90 dias) (DORDAS-PERPINYÀ *et al.*, 2022a). No entanto,  
21 BASTAN; AKCAY (2021) encontraram correlações positivas entre as concentrações  
22 de proAKAP4 e os parâmetros TM, PM e VSL e VCL somente após 3 horas de  
23 incubação dos espermatozoides a 37°C.

24                   Para avaliar a qualidade e fertilidade espermática foi desenvolvida  
25 uma metodologia que quantifica os níveis de proAKAP4 a partir de espermatozoides  
26 (BLOMMAERT *et al.*, 2019; SERGEANT *et al.*, 2019). Esta abordagem é baseada em  
27 um marcador proteico detectado por meio de um kit ELISA que analisa amostras de  
28 sêmen simultaneamente. Com anticorpos altamente específicos do marcador  
29 espermático, este teste funcional não mostra interferências descritas com proteínas  
30 seminais, sangue ou outros elementos químicos em diluentes ou criopreservação.  
31 Além de simples e econômico, o kit 4MID® e as informações fornecidas por esse teste  
32 são confiáveis e de fácil interpretação, proporcionando acompanhamento da  
33 qualidade espermática dentro e entre centros de criação, e durante a idade  
34 reprodutiva do animal (SERGEANT *et al.*, 2019).

1                   A literatura reúne resultados consistentes que destacam a relação  
2 positiva da proAKAP4 com parâmetros que refletem a qualidade espermática, além  
3 de sua associação com taxas de prenhez em biotecnologias reprodutivas (BASTAN;  
4 AKCAY, 2021; BLOMMAERT *et al.*, 2018; RIESCO *et al.*, 2020). Isso sugere que a  
5 proAKAP4 pode ser um marcador confiável de fertilidade para o sêmen (SERGEANT  
6 *et al.*, 2019). No entanto, ainda há uma lacuna na literatura em relação às  
7 concentrações de proAKAP4 em espermatozoides felinos. Em um estudo recente com  
8 espermatozoides ejaculados, não foi encontrada correlação entre proAKAP4 em  
9 nenhum dos parâmetros de motilidade avaliados (PROCHOWSKA; EBERHARDT;  
10 NIŻAŃSKI, 2024). Portanto, são necessários mais estudos para determinar se a  
11 proAKAP4 pode servir como um preditor de motilidade sustentada e capacidade de  
12 congelação no espermatozoide felino.

## 13 2.5 CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA

14                   A criopreservação é uma biotécnica que permite a conservação das  
15 células, por tempo indeterminado, a temperaturas abaixo do ponto de congelação da  
16 água (SILVA; GUERRA, 2011). A criopreservação tem como princípio básico a  
17 redução da temperatura como forma de manter as células em estado quiescente,  
18 preservando sua estrutura, composição celular e capacidade fecundante (DI  
19 DOMENICO; MONTENEGRO; TEIXEIRA, 2015).

20                   No entanto, para o sucesso da criopreservação, é necessário um meio  
21 diluente que possua: fonte nutritiva para as células, proteção das proteínas da  
22 membrana espermática, antibióticos, soluções tampão, antioxidantes para minimizar  
23 os níveis de espécies reativas a oxigênio (ROS), e crioprotetores, que previnam a  
24 formação de cristais de gelo dentro das células (RAHEJA *et al.*, 2018). No gato  
25 doméstico, é preconizado o emprego dos diluentes TRIS (trishidroximetil-  
26 aminometano) ou TEST (ácido sulfônico N-tris-hidroximetil-metil-2-aminometano),  
27 adicionado de frutose ou glicose, não sendo reportadas diferenças entre os dois  
28 açúcares quanto à capacidade de manutenção da qualidade espermática antes  
29 ou após a criopreservação (JIMÉNEZ *et al.*, 2013; JOHNSON, 2018). Nessa espécie,  
30 o crioprotetor, comumente utilizado é o glicerol (VILLAVERDE *et al.*, 2013).

31                   Cabe ressaltar, que o controle da curva de refrigeração é fundamental  
32 para que os espermatozoides interajam com os crioprotetores e ocorra a desidratação

1 gradativa da célula, de modo a reduzir as crioinjúrias. Caso este processo não seja  
2 controlado adequadamente, podem ocorrer danos parcialmente irreversíveis à  
3 motilidade espermática, alterações em membranas acrossomal e plasmática,  
4 diminuição da atividade metabólica e perda dos componentes intracelulares  
5 (SAMPAIO; ZÚCCARI, 2016).

6 Em felinos, geralmente, preconiza-se curvas lentas, sendo o  
7 arrefecimento a 4 °C por uma hora (BURANAAMNUAY, 2017) ou duas horas  
8 (BRUSENTSEV *et al.*, 2018), devido ao comprometimento significativo da integridade  
9 celular e da fertilidade dos espermatozoides pós-descongelção associada às curvas  
10 de refrigeração rápidas (VIZUETE *et al.*, 2014). A congelção dos espermatozoides,  
11 ocorre quando estes são submetidos aos vapores de nitrogênio (-70 °C), seguindo  
12 diferentes protocolos de tempo; 20 minutos (BRUSENTSEV *et al.*, 2018;  
13 BURANAAMNUAY, 2017), 15 minutos (VILLAVARDE *et al.*, 2013), dez minutos  
14 (MANEE-IN *et al.*, 2014) e cinco minutos (THUWANUT *et al.*, 2015).

15 Em relação à descongelção, esta pode ser realizada a 37 ou 38 °C  
16 por 30 segundos (MARTINS; JUSTINO, 2015), embora alguns protocolos optem pela  
17 descongelção ultrarrápida a 70 °C por cinco segundos (KUNKITTI *et al.*, 2017;  
18 VIZUETE *et al.*, 2014). A escolha do protocolo de descongelção depende da curva  
19 de refrigeração utilizada, sendo assim, espermatozoides refrigerados lentamente  
20 serão destinados à descongelção lenta, para permitir a completa dissolução dos  
21 cristais de gelo extracelulares, a diluição dos solutos no meio e a reidratação lenta das  
22 células (MARTINS; JUSTINO, 2015). Em contrapartida, espermatozoides  
23 refrigerados e congelados de forma rápida (4 °C/min) e ultrarrápida (14 °C/min)  
24 (PUKAZHENTHI *et al.*, 1999) devem ser descongelados rapidamente, a fim de evitar  
25 a recristalização do gelo intracelular e potenciais danos à estrutura celular (MARTINS;  
26 JUSTINO, 2015).

27 De fato, a criopreservação é uma biotécnica promissora para resgatar  
28 e/ou prevenir a perda de material genético de machos valiosos ou mesmo de animais  
29 em risco de extinção. Deste modo, mais pesquisas são necessárias para  
30 compreender qual melhor protocolo de colheita espermática que garanta a segurança  
31 do animal e permita maior recuperação espermática com melhor qualidade. Além  
32 disso, estudos proteômicos devem ser conduzidos para investigar as características  
33 fisiológicas dos espermatozoides felinos, contribuindo nos avanços para a  
34 preservação do germoplasma felino.

### 1 3 REFERÊNCIAS

- 2 ACKERMANN, C. L.; LOPES, M. D. Training tom cats for semen collection using an  
3 artificial vagina: a retrospective study. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.  
4 22, n. 12, p. 1155–1159, 2020.
- 5 AGARWAL, A.; SHARMA, R. K.; NELSON, D. R. New semen quality scores developed  
6 by principal component analysis of semen characteristics. **Journal of Andrology**, v.  
7 24, n. 3, p. 343–352, 2003.
- 8 ALMEIDA, A. B. M.; HIDALGO, M. M. T.; DE MORAES, F. L. Z.; TRAUTWEIN, L. G.  
9 C.; DE FÁTIMA SCHNITZER, J.; SILVA, L. A. dos S.; RIZZOTO, G.; FERREIRA, J. C.  
10 P.; MARTINS, M. I. M. The proAKAP4 concentrations in Nelore bull sperm and their  
11 relation to FTAI conception rate results. **Animal Reproduction Science**, v. 247, n.  
12 September, 2022.
- 13 ANDREWS, C. J.; THOMAS, D. G.; YAPURA, J.; POTTER, M. A. Reproductive biology  
14 of the 38 extant felid species: a review. **Mammal Review**, v. 49, n. 1, p. 16–30, 2019.
- 15 ANGRIMANI, D. S. R.; LUCIO, C. F.; LOSANO, J. D. A.; BRITO, M. M.; VEIGA, G. A.  
16 L.; VANNUCCHI, C. I. Maturação epididimária em cães. **Revista Portuguesa de**  
17 **Ciências Veterinárias**, v. 112, p. 1–11, 2017.
- 18 ANGRIMANI, D. S. R.; LÚCIO, C. F.; VEIGA, G. A. L.; REGAZZI, F. M.; SILVA, L. C.  
19 G.; NICHI, M.; VANNUCCHI, C. I. Biotécnicas reprodutivas com o emprego de  
20 espermatozoides epididimários em cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**,  
21 v. 37, n. 4, p. 323–327, 2013.
- 22 ANGRIMANI, D. S. R.; NAGAI, K. K.; RUI, B. R.; BICUDO, L. C.; LOSANO, J. D. A.;  
23 BRITO, M. M.; FRANCISCHINI, M. C. P.; NICHI, M. Spermatic and oxidative profile of  
24 domestic cat (*Felis catus*) epididymal sperm subjected to different cooling times (24,  
25 48 and 72 hours). **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 1, p. 163–170, 2018.
- 26 ARAUJO, G. R. De; ANTÔNIO, T.; PAULA, R. De; DECO-SOUZA, T. De; MORATO,  
27 R. G.; BERGO, L. C. F.; CRUZ, L.; COSTA, D. S.; BRAUD, C. Comparison of semen  
28 samples collected from wild and captive jaguars (*Panthera onca*) by urethral  
29 catheterization after pharmacological induction. **Animal Reproduction Science**, v.

- 1 195, p. 1–7, 2018. Disponível em:  
2 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.12.019>>.
- 3 ARRUDA, R. P. de; CELEGHINI, E. C. C.; GARCIA, A. R.; CARLI, G. De; LEITE, T.  
4 G.; OLIVEIRA, L. Z.; LANÇONI, R.; RODRIGUES, M. D. P. Morfologia espermática de  
5 touros: interpretação e impacto na fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução**  
6 **Animal**, v. 39, n. 1, p. 47–60, 2015.
- 7 ARRUDA, R.; SILVA, D.; AFFONSO, F.; LEMES, K.; JAIMES, J.; ALONSO, M.;  
8 CARVALHO, H.; OLIVEIRA, L.; NASCIMENTO, J. Métodos de avaliação da  
9 morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista**  
10 **Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 145–151, 2011.
- 11 AXNÉR, E. Updates on Reproductive Physiology, Genital Diseases and Artificial  
12 Insemination in the Domestic Cat. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n.  
13 SUPPL.2, p. 144–149, 2008.
- 14 AXNÉR, E.; LINDE FORSBERG, C. Sperm Morphology in the Domestic Cat, and its  
15 Relation with Fertility: A Retrospective Study. **Reproduction in domestic animals**, v.  
16 42, n. 3, p. 282–291, 2007.
- 17 BARBOSA, B. de S.; IZZO, R. G.; SILVA, H. V. R.; NUNES, T. G. P.; BRITO, B. F.;  
18 SILVA, T. F. P. da; SILVA, L. D. M. da. Recovery and cryopreservation of epididymal  
19 sperm from domestic cat using powdered coconut water (ACP-117c) and TRIS  
20 extenders. **Cryobiology**, v. 92, n. August 2019, p. 103–108, 2020. Disponível em:  
21 <<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.11.042>>.
- 22 BASTAN, I.; AKCAY, E. Quality assessment of frozen bull semen with the precursor  
23 A-kinase anchor protein 4 biomarker. **Andrologia**, v. 53, n. 9, p. 1–8, 2021.
- 24 BATISTA, A. M.; GUERRA, M. M. P. Novas técnicas para avaliação da qualidade do  
25 sêmen caprino. **Rev. Bras. Reprod. Animal**, v. 34, n. 3, p. 125–132, 2010.
- 26 BERGSTEIN, T. G.; WEISS, R. R.; BICUDO, S. D. Técnicas de análise de sêmen.  
27 **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 4, p. 189–194, 2014.
- 28 BLOMMAERT, D.; SERGEANT, N.; DELEHEDDE, M.; FRANCK, T.; LEJEUNE, J. P.;

- 1 SERTEYN, D. Significant Correlation Between the proAKAP4 Concentration and the  
2 Total and Progressive Motility in Stallion Sperm After Thawing. **Journal of Equine**  
3 **Veterinary Science**, v. 66, p. 43, 2018. Disponível em:  
4 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2018.05.019>>.
- 5 BLOMMAERT, D.; SERGEANT, N.; DELEHEDDE, M.; JOUY, N.; MITCHELL, V.;  
6 FRANCK, T.; DONNAY, I.; LEJEUNE, J. P.; SERTEYN, D. Expression, localization,  
7 and concentration of A-kinase anchor protein 4 (AKAP4) and its precursor (proAKAP4)  
8 in equine semen: Promising marker correlated to the total and progressive motility in  
9 thawed spermatozoa. **Theriogenology**, v. 131, p. 52–60, 2019. Disponível em:  
10 <<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.011>>.
- 11 BOMPART, D.; VÁZQUEZ, R. F.; GÓMEZ, R.; VALVERDE, A.; ROLDÁN, E. R. S.;  
12 GARCÍA-MOLINA, A.; SOLER, C. Combined effects of type and depth of counting  
13 chamber, and rate of image frame capture, on bull sperm motility and kinematics.  
14 **Animal Reproduction Science**, v. 209, n. August, p. 106169, 2019. Disponível em:  
15 <<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106169>>.
- 16 BRITO, L. F. C. Evaluation of stallion sperm morphology. **Clinical Techniques in**  
17 **Equine Practice**, v. 6, p. 249–264, 2007.
- 18 BRUSENTSEV, E.; KIZILOVA, E.; MOKROUSOVA, V.; KOZHEVNIKOVA, V.;  
19 ROZHKOVA, I.; AMSTISLAVSKY, S. Characteristics and fertility of domestic cat  
20 epididymal spermatozoa cryopreserved with two different freezing media.  
21 **Theriogenology**, v. 110, p. 148–152, 2018. Disponível em:  
22 <<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.12.038>>.
- 23 BURANAAMNUAY, K. Protocols for sperm cryopreservation in the domestic cat: A  
24 review. **Animal Reproduction Science**, v. 183, n. November 2016, p. 56–65, 2017.  
25 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.06.002>>.
- 26 CARDOSO, J. F. S.; PAULA, N. R. de O.; UCHOA, D. C.; SILVA, L. D. M. da.  
27 Diferentes concentrações de gema de ovo na qualidade do sêmen canino diluído em  
28 ACP®-106 e resfriado a 4 °c. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 146–152, 2010.
- 29 CARNEIRO, J. da S.; MOTHEO, T. F. Pharmacological semen collection in domestic  
30 and wild canids and felids: literature review. **Animal Reproduction**, v. 20, n. 4, p.

- 1 e20230036, 2023.
- 2 CARRACEDO, S.; BRIAND-AMIRAT, L.; DORDAS-PERPINYÀ, M.; RAMOS  
3 ESCUREDO, Y.; DELCOMBEL, R.; SERGEANT, N.; DELEHEDDE, M. ProAKAP4  
4 protein marker: Towards a functional approach to male fertility. **Animal Reproduction  
5 Science**, v. 247, n. June, 2022.
- 6 CATARDO, F. A.; SCOLARI, S.; MÁ S-ROSA, S. Coleta De Sêmen Em Felinos  
7 Selvagens Visando À Conservação – Revisão Bibliográfica. **Rev Ciênc Med Vet**, v.  
8 30, n. 14, p. 1–11, 2018.
- 9 CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3rd. ed. [s.l.:  
10 s.n.]104 p.
- 11 CHATDARONG, K. Retained fertilizing capability in cryopreserved feline spermatozoa.  
12 **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, p. 261–264, 2017.
- 13 CHEUQUEMÁN, C.; FAÚNDEZ, R.; SÁNCHEZ, R.; RISOPATRÓN, J. Changes in  
14 sperm function and structure after freezing in domestic cat spermatozoa. **Andrologia**,  
15 v. 50, n. 9, p. 1–8, 2018.
- 16 CODINA, M.; ESTANYOL, J. M.; FIDALGO, M. J.; BALLESCÀ, J. L.; OLIVA, R.  
17 Advances in sperm proteomics: Best-practise methodology and clinical potential.  
18 **Expert Review of Proteomics**, v. 12, n. 3, p. 255–277, 2015.
- 19 DAVIDSON, A. P.; BAKER, T. W. Reproductive Ultrasound of the Dog and Tom.  
20 **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 24, n. 2, p. 64–70, 2009. Disponível em:  
21 <<http://dx.doi.org/10.1053/j.tcam.2008.11.003>>.
- 22 DCUNHA, R.; HUSSEIN, R. S.; ANANDA, H.; KUMARI, S.; ADIGA, S. K.; KANNAN,  
23 N.; ZHAO, Y.; KALTHUR, G. Current Insights and Latest Updates in Sperm Motility  
24 and Associated Applications in Assisted Reproduction. **Reproductive Sciences**, v.  
25 29, n. 1, p. 7–25, 2022.
- 26 DE ANDRADE, A. F. C.; DE ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO,  
27 J.; MARTINS, S. M. M. K.; RAPHAEL, C. F.; MORETTI, A. S. Fluorescent stain method  
28 for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma

- 1 and acrosomal membranes in boar sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v.  
2 42, n. 2, p. 190–194, 2007.
- 3 DELEHEDDE, M.; BLOOMAERT, D.; JOUY, N.; SCABELLO, J.; MIERSMAN, H.;  
4 FRANCK, T.; SERTEYN, D.; MITCHELL, V.; SERGEANT, N. Concentration of  
5 proAKAP4 as a pertinent read-out of sperm quality in mammals. **Animal**  
6 **Reproduction Science**, v. 194, p. e24, 2018. Disponível em:  
7 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.04.053>>.
- 8 DELEHEDDE, M.; CARRACEDO, S.; SELLESLAGH, M.; EDDARKAOUI, S.; AMIRAT-  
9 BRIAND, L.; SERGEANT, N. ProAKAP4 polypeptide as a biomarker of sperm  
10 functionality and male fertility disorders Abbreviations: AKAP4: A-kinase anchor  
11 protein 4; PKA: protein kinase A. **International Journal of Gynecology and**  
12 **Reproductive Sciences Int J Gynecol and Reprod Sci**, v. 2, n. 1, p. 13–19, 2019a.  
13 Disponível em: <[www.ologypress.com/submit-article](http://www.ologypress.com/submit-article)>.
- 14 DELEHEDDE, M.; DEMOUVEAUX, B.; G, R.; SELLESLAGH, M.; DEWULF, Q.;  
15 DESSEYN, J.-L.; MOREAU, P.; GOSSET, P.; PICHAVANT, M.; SERGEANT, N.  
16 ProAKAP4 concentrations as an indicator of good spermatogenesis and sperm quality  
17 under oxidative stress conditions. **Andrology**, v. 7, n. 1, p. 85, 2019b.
- 18 DI DOMENICO, D.; MONTENEGRO, E. M. S. R. P.; TEIXEIRA, P. P. M. Diferenças  
19 da célula espermática suína e crioprotetores: Revisão. **Nucleus Animalium**, v. 7, n.  
20 1, p. 31–42, 2015.
- 21 DORDAS-PERPINYÀ, M.; SERGEANT, N.; RUELLE, I.; BRUYAS, JEAN-FRANÇOIS  
22 CHARREAUX, F.; MICHAUD, S.; CARRACEDO, S.; CATALÁN, J.; MIRÓ, J.;  
23 DELEHEDDE, M.; BRIAND-AMIRAT, L. ProAKAP4 Semen Concentrations as a  
24 Valuable Marker Protein of Post-Thawed Semen Quality and Bull Fertility: A  
25 Retrospective Study. **Veterinary Sciences**, v. 9, p. 224, 2022a.
- 26 DORDAS-PERPINYÀ, M.; YANEZ-ORTIZ, I.; SERGEANT, N.; MEVEL, V.; BRUYAS,  
27 J. F.; CATALÁN, J.; DELEHEDDE, M.; BRIAND-AMIRAT, L.; MIRÓ, J. ProAKAP4  
28 Concentration Is Related to Sperm Motility and Motile Sperm Subpopulations in  
29 Frozen–Thawed Horse Semen. **Animals**, v. 12, n. 23, p. 1–11, 2022b.
- 30 DOS SANTOS, J. F. P.; GOSMES, E. T.; SIQUEIRA, A. K. M.; CARDOSO, R. de C.

- 1 S. Andrologia e criopreservação de sêmen em cães. **Revista Brasileira de**  
2 **Reprodução Animal**, v. 40, n. 4, p. 167–179, 2016. Disponível em:  
3 <www.cbra.org.br>.
- 4 DUQUE, F. J.; DOMINGUEZ-ROLDAN, J. M.; MARTINEZ-TABOADA, F.; MACÍAS-  
5 GARCÍA, B.; RODRÍGUEZ-MEDINA, P. Research in Veterinary Science Effects of  
6 medetomidine and medetomidine-butorphanol on transcranial color-coded duplex  
7 ultrasonography in healthy dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n. 2, p. 648–  
8 653, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.04.010>.
- 9 DURU, N. K.; MORSHEDI, M.; SCHUFFNER, A.; OEHNINGER, S. Cryopreservation-  
10 thawing of fractionated human spermatozoa and plasma membrane translocation of  
11 phosphatidylserine. **Fertility and Sterility**, v. 75, n. 2, p. 263–268, 2001.
- 12 FANG, X.; HUANG, L. L.; XU, J.; MA, C. Q.; CHEN, Z. H.; ZHANG, Z.; LIAO, C. H.;  
13 ZHENG, S. X.; HUANG, P.; XU, W. M.; LI, N.; SUN, L. Proteomics and single-cell RNA  
14 analysis of Akap4-knockout mice model confirm indispensable role of Akap4 in  
15 spermatogenesis. **Developmental Biology**, v. 454, n. 2, p. 118–127, 2019.
- 16 FARRELL, P. B.; PRESICCE, G. A.; BROCKETT, C. C.; FOOTE, R. H. Quantification  
17 of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA)  
18 and the relationship to fertility. **Theriogenology**, v. 49, n. 4, p. 871–879, 1998.
- 19 FILLIERS, M.; RIJSSELAERE, T.; BOSSAERT, P.; DE CAUSMAECKER, V.;  
20 DEWULF, J.; POPE, C. E.; VAN SOOM, A. Computer-assisted sperm analysis of fresh  
21 epididymal cat spermatozoa and the impact of cool storage (4 °C) on sperm quality.  
22 **Theriogenology**, v. 70, n. 9, p. 1550–1559, 2008.
- 23 FILLIERS, M.; RIJSSELAERE, T.; BOSSAERT, P.; ZAMBELLI, D.; ANASTASI, P.;  
24 HOOGEWIJS, M.; VAN SOOM, A. In vitro evaluation of fresh sperm quality in tomcats:  
25 A comparison of two collection techniques. **Theriogenology**, v. 74, n. 1, p. 31–39,  
26 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.12.016>.
- 27 FRANKLIN, A. D.; WADDELL, W. T.; GOODROWE, K. L. Red wolf (*Canis rufus*) sperm  
28 quality and quantity is affected by semen collection method, extender components,  
29 and post-thaw holding temperature. **Theriogenology**, v. 116, p. 41–48, 2018.  
30 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.05.007>.

- 1 GERRESHEIM, G.; SCHWEMMER, U. Dexmedetomidin. **Anaesthetist**, v. 62, n. 8, p.  
2 661–674, 2013.
- 3 GLIOZZI, T. M.; TURRI, F.; MANES, S.; CASSINELLI, C.; PIZZI, F. The combination  
4 of kinetic and flow cytometric semen parameters as a tool to predict fertility in  
5 cryopreserved bull semen. **Animal**, p. 1–8, 2017.
- 6 GOBELLO, C. Key aspects of domestic cat spermatogenesis. **Reproduction in**  
7 **Domestic Animals**, v. 57, n. 5, p. 459–464, 2022.
- 8 GRIFFIN, R. A.; SWEGEN, A.; BAKER, M.; AITKEN, R. J.; RODRIGUEZ, A. S.;  
9 MARTÍN-CANO, F. E.; NIXON, B.; PENÃ, F. J.; DELEHEDDE, M.; SERGEANT, N.;  
10 GIBB, Z. Mass spectrometry reveals distinct proteomic profiles in high- and low-quality  
11 stallion spermatozoa. **Reproduction**, v. 160, n. 5, p. 695–707, 2020.
- 12 GUPTA, S.; HANDA, K.; KASLIWAL, R.; BAJPAI, P. A case of Kartagener's syndrome:  
13 Importance of early diagnosis and treatment. **Indian Journal of Human Genetics**, v.  
14 18, n. 2, p. 263–267, 2012.
- 15 HALLAP, T.; NAGY, S.; JAAKMA, Ü.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ,  
16 H. Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro  
17 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed  
18 spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. **Theriogenology**, v. 65, n. 6, p. 1122–  
19 1136, 2006.
- 20 HENKEL, R.; MAASS, G.; BÖDEKER, R. H.; SCHEIBELHUT, C.; STALF, T.;  
21 MEHNERT, C.; SCHUPPE, H. C.; JUNG, A.; SCHILL, W. B. Sperm function and  
22 assisted reproduction technology. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 4, n. 1, p.  
23 7–30, 2005.
- 24 HERMANSSON, U.; AXNÉR, E. Epididymal and ejaculated cat spermatozoa are  
25 resistant to cold shock but egg yolk promotes sperm longevity during cold storage at 4  
26 °C. **Theriogenology**, v. 67, n. 7, p. 1239–1248, 2007.
- 27 HIDALGO, M. M. T.; DE ALMEIDA, A. B. M.; SILVA, L. A. S.; GREGHI, J. R.; SILVA,  
28 V. W.; SAMBATTI, N. R.; TRAUTWEIN, L. G. C.; MARTINS, M. I. M. Comparison of  
29 two pharmacological semen collection times with  $\alpha$ 2-adrenergic agonist in domestic

- 1 cats. **Reproduction in Domestic Animals**, n. June, p. 1–7, 2023.
- 2 HIDALGO, M.; RODRÍGUEZ, I.; DORADO, J. Influence of staining and sampling  
3 procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer.  
4 **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 996–1003, 2006.
- 5 HIDALGO, M.; RODRIGUEZ, I.; DORADO, J.; SANZ, J.; SOLER, C. Effect of sample  
6 size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class  
7 Analyzer. **Veterinarni Medicina**, v. 50, n. 1, p. 24–32, 2005.
- 8 HOLT, W. V.; CUMMINS, J. M.; SOLER, C. Computer-assisted sperm analysis and  
9 reproductive science; A gift for understanding gamete biology from multidisciplinary  
10 perspectives. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 30, n. 6, p. iii–v, 2018.
- 11 HOSSAIN, M. S.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; NAGY, S.; SIQUEIRA, A. P.;  
12 RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Flow cytometry for the assessment of animal sperm  
13 integrity and functionality: State of the art. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, n. 3, p.  
14 406–419, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/aja.2011.15>>.
- 15 HOWARD, J. G. Semen collection and analysis in carnivores. *In*: **Zoo and wild animal**  
16 **medicine: current therapy**. [s.l: s.n.]p. 390–399.
- 17 JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle  
18 membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability,  
19 chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology**, v. 60, n. 4, p. 743–758, 2003.
- 20 JEWGENOW, K.; NEUBAUER, K.; BLOTTNER, S.; SCHÖN, J.; WILDT, D. E.;  
21 PUKAZHENTHI, B. S. Reduced germ cell apoptosis during spermatogenesis in the  
22 teratospermic domestic cat. **Journal of Andrology**, v. 30, n. 4, p. 460–468, 2009.
- 23 JIMÉNEZ, E.; PÉREZ-MARÍN, C. C.; VIZUETE, G.; MILLÁN, Y.; AGÜERA, E. Effect  
24 of different extenders on in vitro characteristics of feline epididymal sperm during  
25 cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 4, p. 665–672, 2013.
- 26 JOHNSON, A. K. Assisted Reproduction in the Male Cat. **Veterinary Clinics of North**  
27 **America - Small Animal Practice**, v. 48, n. 4, p. 511–521, 2018. Disponível em:  
28 <<https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2018.02.001>>.

- 1 JOHNSON, A. K. Normal feline reproduction: The tom. **Journal of Feline Medicine**  
2 **and Surgery**, v. 24, n. 3, p. 212–220, 2022.
- 3 JULIÃO, G. .; ABIMUSSI, C. J. X. Uso de dexmedetomidina em Medicina Veterinária:  
4 revisão de literatura. **Revista de educação continuada em Medicina Veterinária e**  
5 **Zootecnia do CRMV-SP**, v. 17, n. 1, p. 26–32, 2019.
- 6 JUMEAU, F.; SIGALA, J.; DOSSOU-GBETE, F.; FRIMAT, K.; BARBOTIN, A. L.;  
7 BUÉE, L.; BÉHAL, H.; SERGEANT, N.; MITCHELL, V. A-kinase anchor protein 4  
8 precursor (pro-AKAP4) in human spermatozoa. **Andrology**, v. 6, n. 6, p. 854–859,  
9 2018.
- 10 KATHIRAVAN, P.; KALATHARAN, J.; KARTHIKEYA, G.; RENGARAJAN, K.;  
11 KADIRVEL, G. Objective Sperm Motion Analysis to Assess Dairy Bull Fertility Using  
12 Computer-Aided System - A Review. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n.  
13 1, p. 165–172, 2011.
- 14 KUMAR, N.; SINGH, N. K. An Insight into Novel Sperm Cell Proteins as Bio-markers  
15 for Male Infertility: A Review. **Current Molecular Medicine**, v. 21, n. 10, p. 850–859,  
16 dez. 2021. Disponível em: <<https://www.eurekaselect.com/190556/article>>.
- 17 KUNKITTI, P.; CHATDARONG, K.; SUWIMONTEERABUTR, J.; NEDUMPUN, T.;  
18 JOHANNISSON, A.; BERGQVIST, A.; SJUNNESSON, Y.; AXNÉR, E. Osmotic  
19 tolerance of feline epididymal spermatozoa. v. 185, n. March, p. 148–153, 2017.
- 20 LE COUZAZER, D.; DELEHEDDE, M.; RUELLE, I.; SERGEANT, N.; MICHAUD, S.;  
21 BRIAND, L.; BENCHARIF, D. ProAKAP4 as a valuable marker to assess sperm quality  
22 in Dogs. In: 22nd Congress of the European-Veterinary-Society-for-Small-Animal-  
23 Reproduction (EVSSAR), 2019, [...]. **Reproduction in Domestic Animals**, 2019. p. 91–  
24 92.
- 25 LUCONI, M.; CANTINI, G.; BALDI, E.; FORTI, G. Role of a-kinase anchoring proteins  
26 (AKAPs) in reproduction. **Frontiers in Bioscience Landmark**, v. 16, n. 4, p. 1315–  
27 1330, 2011.
- 28 LUEDERS, I.; LUTHER, I.; SCHEEPERS, G.; HORST, G. Van Der. Improved semen  
29 collection method for wild felids : Urethral catheterization yields high sperm quality in

- 1 African lions. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 696–701, 2012. Disponível em:  
2 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.02.026>>.
- 3 LUVONI, G. C.; MORSELLI, M. G. Canine epididymal spermatozoa : A hidden treasure  
4 with great potential. v. 52, p. 197–201, 2017.
- 5 MACENTE, B. I.; FERNANDO, C. M. M.; PEREIRA, M. M.; MARTINS, M. I. M.;  
6 GIOSO, M. M.; SAVI, P. A. P.; GUTIERREZ, R. R. Congelação de espermatozoides  
7 epididimários de gatos utilizando o diluidor Botu-Crio® após refrigeração por 24H em  
8 contêiner de transporte de sêmen Botu- Tainer®. v. 6, n. 2, p. 112–117, 2012.
- 9 MADRIGAL-VALVERDE, M.; BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO FILHO, A. D. L.;  
10 BARBOSA, V. F.; VIEIRA, C. A.; ROMÃO, E. A.; CARNEIRO, I. B.; AZEVEDO, M. C.;  
11 ARAUJO, G. R. Quality of domestic cat semen collected by urethral catheterization  
12 after the use of different alpha 2-adrenergic agonists. **Journal of Feline Medicine and**  
13 **Surgery**, v. 23, n. 8, p. 745–750, 2021.
- 14 MALO, C.; CARRACEDO, S.; DELEHEDDE, M.; SERGEANT, N.; SKIDMORE, J. A.  
15 Identification of proAKAP4 concentration variations in dromedary sperm and their  
16 correlation with monthly semen parameters. **Reproduction and Fertility**, v. 2, n. 4, p.  
17 268–279, 2021.
- 18 MANEE-IN, S.; PARMORNSUPORNVICHIT, S.; KRAIPRAYOON, S.; THARASANIT,  
19 T.; CHANAPIWAT, P.; KAEOKET, K. L-carnitine supplemented extender improves  
20 cryopreserved-thawed cat epididymal sperm motility. **Asian-Australasian Journal of**  
21 **Animal Sciences**, v. 27, n. 6, p. 791–796, 2014.
- 22 MARTINS, M. I. .; LEVY, X.; NUDELMAN, N.; ROUTIER, J.; ELBAZ, J.; FONTBONNE,  
23 A. New stimulation protocol of electroejaculation for semen collection in cheetahs. In:  
24 International Symposium on Canine and Feline Reproduction (ISCFR), 2016, Paris.  
25 [...]. Paris: 2016. p. 166.
- 26 MARTINS, M. I. M. Perspectivas da aplicação comercial de biotecnologias envolvendo  
27 espermatozóides obtidos de epidídimo de cães e gatos. **Revista Brasileira de**  
28 **Reprodução Animal**, v. 31, n. 1, p. 115–118, 2007.
- 29 MARTINS, M. I. M.; ALMEIDA, A. B. M. de; HIDALGO, M. M. T. Biotecnologias na

- 1 preservação de espermatozoides felinos. **Ciência Animal**, v. 32, n. 2, p. 85–100,  
2 2022.
- 3 MARTINS, M. I. M.; JUSTINO, R. C. Criopreservação espermática em felinos: estado  
4 da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 1, p. 129–135, 2015.
- 5 MIKI, K.; WILLIS, W. D.; BROWN, P. R.; GOULDING, E. H.; FULCHER, K. D.; EDDY,  
6 E. M. Targeted disruption of the Akap4 gene causes defects in sperm flagellum and  
7 motility. **Developmental Biology**, v. 248, n. 2, p. 331–342, 2002.
- 8 MOREIRA, N. Exame andrológico e criopreservação de sêmen em felídeos selvagens  
9 Andrological evaluation and semen cryopreservation in wild felids. **Rev. Bras. Reprod.**  
10 **Anim. Belo Horizonte**, v. 41, n. 1, p. 312–315, 2017. Disponível em:  
11 <[www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br)>.
- 12 MORETTI, E.; SCAPIGLIATI, G.; PASCARELLI, N. A.; BACCETTI, B.; COLLODEL,  
13 G. Localization of AKAP4 and tubulin proteins in sperm with reduced motility. **Asian**  
14 **Journal of Andrology**, v. 9, n. 5, p. 641–649, 2007.
- 15 MORTIMER, D.; MENKVELD, R. Sperm morphology assessment - Historical  
16 perspectives and current opinions. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 2, p. 192–205,  
17 2001.
- 18 MPHAPHATHI, M.; LEDWABA, M.; THEMA, M. The Current Status of Semen and  
19 Oocytes Cryopreservation. *In: Cryopreservation- Applications and Challenges*. [s.l.:  
20 s.n.]
- 21 MÜLLER, G.; MARTINO-ANDRADE, A. J.; SANTOS, A. S.; REGHELIN, A. L.;  
22 GARCIA, D. M.; SANT'ANA, G. R.; SPERCOSKI, K. M.; MEYER, K. B.; TORRES, S.  
23 M.; SILVA JÚNIOR, V. A.; MORAIS, R. N. Testicular testosterone: Estradiol ratio in  
24 domestic cats and its relationship to spermatogenesis and epididymal sperm  
25 morphology. **Theriogenology**, v. 78, n. 6, p. 1224–1234, 2012. Disponível em:  
26 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.05.018>>.
- 27 NARESH, S.; ATREJA, S. K. Detection, Localization and Tyrosine Phosphorylation  
28 Status of Ser/Thr Protein Phosphatase1 $\gamma$  in Freshly Ejaculated, In Vitro Capacitated  
29 and Cryopreserved Buffalo Spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50,

- 1 n. 6, p. 901–909, 2015.
- 2 NASRALLAH, F. A.; KANG, S.; LOW, A. S.; CHUANG, K. NeuroImage Neural correlate  
3 of resting-state functional connectivity under  $\alpha$  2 adrenergic receptor agonist ,  
4 medetomidine. **NeuroImage**, v. 84, p. 27–34, 2014. Disponível em:  
5 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.08.004>>.
- 6 PEÑA, A. I.; LUGILDE, L. L.; BARRIO, M.; HERRADÓN, P. G.; QUINTELA, L. A.  
7 Effects of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and  
8 intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v. 59, n. 8, p.  
9 1725–1739, 2003.
- 10 PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; ROLDAN, E. Permeability of boar and bull  
11 spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin:  
12 accuracy in the assessment of cell viability. **Journal of Reproduction and Fertility**,  
13 v. 118, n. 1, p. 145–152, 2000.
- 14 PROCHOWSKA, S.; EBERHARDT, M.; NIŻAŃSKI, W. Evaluation of a commercial  
15 proAKAP4 kit for the assessment of fresh and frozen–thawed feline spermatozoa.  
16 **Reproduction in Domestic Animals**, v. 59, n. 3, 2024.
- 17 PROCHOWSKA, S.; NIŻAŃSKI, W. In vitro fertilizing potential of urethral and  
18 epididymal spermatozoa collected from domestic cats (*Felis catus*). **Polish Journal of**  
19 **Veterinary Sciences**, v. 20, n. 1, p. 19–24, 2017.
- 20 PROCHOWSKA, S.; PARTYKA, A.; NIŻAŃSKI, W. Expression of apoptosis-related  
21 genes in cat testicular tissue in relation to sperm morphology and seasonality—a  
22 preliminary study. **Animals**, v. 11, n. 2, p. 1–10, 2021.
- 23 PUKAZHENTHI, B.; NEUBAUER, K.; JEWGENOW, K.; HOWARD, J.; WILDT, D. The  
24 impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives.  
25 **Theriogenology**, v. 66, n. 1, p. 112–121, 2006.
- 26 PUKAZHENTHI, B.; PELICAN, K.; WILDT, D.; HOWARD, J. Sensitivity of Domestic  
27 Cat (*Felis catus*) Sperm from Normospermic versus Teratospermic Donors to Cold-  
28 Induced Acrosomal Damage<sup>1</sup>. **Biology of Reproduction**, v. 61, n. 1, p. 135–141,  
29 1999.

- 1 PUKAZHENTHI, B.; WILDT, D. E.; HOWARD, J. G. The phenomenon and significance  
2 of teratospermia in felids. **Journal of reproduction and fertility. supplement**, v. 57,  
3 p. 423–433, 2001.
- 4 RAHEJA, N.; CHOUDHARY, S.; GREWAL, S.; SHARMA, N. A review on semen  
5 extenders and additives used in cattle and buffalo bull semen preservation. **Journal**  
6 **of Entomology and Zoology Studies**, v. 6, n. 3, p. 239–245, 2018.
- 7 RIESCO, M. F.; ANEL-LOPEZ, L.; NEILA-MONTERO, M.; PALACIN-MARTINEZ, C.;  
8 MONTES-GARRIDO, R.; ALVAREZ, M.; DE PAZ, P.; ANEL, L. Proakap4 as novel  
9 molecular marker of sperm quality in ram: An integrative study in fresh, cooled and  
10 cryopreserved sperm. **Biomolecules**, v. 10, n. 7, p. 1–21, 2020.
- 11 RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Semen evaluation techniques and their relationship with  
12 fertility. **Animal Reproduction**, v. 10, n. 3, p. 148–159, 2013.
- 13 ROMAGNOLI, N.; ZAMBELLI, D.; CUNTO, M.; VENTRELLA, D.; TOALDO, M. B. Non-  
14 invasive evaluation of the haemodynamic effects of high-dose medetomidine in healthy  
15 cats for semen collection. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 18, n. 4, p.  
16 337–343, 2015.
- 17 SAMPAIO, B. F. B.; ZÚCCARI, C. E. S. N. Adição de antioxidantes hidro e  
18 lipossolúveis ao diluidor de refrigeração do sêmen equino–revisão de literatura.  
19 **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 17, n. 11, p. 1–28, 2016.
- 20 SCHNITZER, J. de F.; HIDALGO, M. M. T.; TRAUTWEIN, L. G. C.; ALMEIDA, A. B.  
21 M.; SOUZA, A. K.; MARTINS, M. I. M. Determination of cat sperm concentration using  
22 the CASA system. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 11, p. 22791–22806,  
23 2019.
- 24 SERGEANT, N.; BRIAND-AMIRAT, L.; BENCHARIF, D.; DELEHEDDE, M. The Sperm  
25 Specific Protein Proakap4 as an Innovative Marker to Evaluate Sperm Quality and  
26 Fertility. **Journal of Dairy & Veterinary Sciences**, v. 11, n. 1, 2019.
- 27 SILVA, M. .; JORGE-NETO, P. N.; MARTINS, G.; CSERMAK-JR, A. C.; ZANELLA, R.;  
28 SCHILBACH, C.; COLBACHINI, H.; RODRIGUES, A.; ARAÚJO, G. R.; DECO-  
29 SOUZA, T. Reproductive parameters of male crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*)

- 1 subjected to pharmacological semen collection by urethral catheterization.  
2 **Theriogenology Wild**, v. 1, n. June, p. 100004, 2022.
- 3 SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células  
4 espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de**  
5 **Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, p. 370–384, 2011. Disponível em:  
6 <www.cbpa.org.br>.
- 7 SIMONIK, O.; SICHTAR, J.; KREJCARKOVA, A.; RAJMON, R.; STADNIK, L.;  
8 BERAN, J.; DOLEZALOVA, M.; BINIOVA, Z. Computer assisted sperm analysis - The  
9 relationship to bull field fertility, possible errors and their impact on outputs: A review.  
10 **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 85, n. 1, p. 3–11, 2015.
- 11 SINGH, A. K.; KUMAR, A.; BISLA, A. Computer-assisted sperm analysis (CASA) in  
12 veterinary science: A review. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 91, n. 6, p. 419–  
13 429, 2021.
- 14 SOUZA, A. K.; TRAUTWEIN, L. G. C.; PARANZINI, C. S.; PERENCIN, F. M.;  
15 CARDOSO, G. S.; MARTINS, M. I. M. Influence of cooling temperature in sperm  
16 subpopulations of domestic cats. **Animal Reproduction Science**, v. 189, n. June  
17 2017, p. 1–10, 2018. Disponível em:  
18 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.12.015>>.
- 19 SRINGAM, S.; KITIYANANT, Y.; LEWIN, L. M.; SAIKHUN, K. Semen quality and  
20 chromatin condensation in domestic cat sperm during passage through the epididymis.  
21 **Kasetsart Journal - Natural Science**, v. 45, n. 1, p. 46–58, 2011.
- 22 SWANSON, W. F.; BATEMAN, H. L.; VANSANDT, L. M. Urethral catheterization and  
23 sperm vitrification for simplified semen banking in felids. **Reproduction in Domestic**  
24 **Animals**, v. 52, p. 255–260, 2017.
- 25 THONGPHAKDEE, A.; SUKPARANGSI, W.; COMIZZOLI, P.; CHATDARONG, K.  
26 Reproductive biology and biotechnologies in wild felids. **Theriogenology**, v. 150, p.  
27 360–373, 2020.
- 28 THUWANUT, P.; ARYA, N.; COMIZZOLI, P.; CHATDARONG, K. Effect of extracellular  
29 adenosine 5'-triphosphate on cryopreserved epididymal cat sperm intracellular ATP

- 1 concentration, sperm quality, and in vitro fertilizing ability. **Theriogenology**, v. 84, n.  
2 5, p. 702–709, 2015. Disponível em:  
3 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.05.003>>.
- 4 TOYONAGA, M.; TSUTSUI, T. The quality of cryopreserved sperm collected from  
5 feline caudal epididymides using seminal plasma. **Journal of Veterinary Medical**  
6 **Science**, v. 74, n. 10, p. 1349–1353, 2012.
- 7 TSUTSUI, T.; WADA, M.; ANZAI, M.; HORI, T. Artificial Insemination with Frozen  
8 Epididymal Sperm in Cats. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 65, n. 3, p.  
9 397–399, 2003. Disponível em:  
10 <<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jvms/65.397?from=CrossRef>>.
- 11 TURNER, R. M. O.; JOHNSON, L. R.; HAIG-LADEWIG, L.; GERTON, G. L.; MOSS,  
12 S. B. An X-linked gene encodes a major human sperm fibrous sheath protein,  
13 hAKAP82. Genomic organization, protein kinase A-RII binding, and distribution of the  
14 precursor in the sperm tail. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 48, p. 32135–  
15 32141, 1999.
- 16 VANSANDT, L. M.; BATEMAN, H. L.; MILLER, A. G.; HERRICK, J. R.; MORESCO,  
17 A.; GONZÁLEZ, R.; IWANIUK, M. E.; SWANSON, W. F. Cross-species efficacy of a  
18 chemically-defined, soy lecithin-based cryomedium for semen banking in imperiled  
19 wild felids. **Theriogenology**, v. 159, p. 108–115, 2021.
- 20 VIJAYARAGHAVAN, S.; LIBERTY, G. A.; MOHAN, J.; WINFREY, V. P.; OLSON, G.  
21 E.; CARR, D. W. Isolation and molecular characterization of AKAP110, a novel, sperm-  
22 specific protein kinase A-anchoring protein. **Molecular Endocrinology**, v. 13, n. 5, p.  
23 705–717, 1999.
- 24 VILLAVERDE, A. I. S. B.; FIORATTI, E. G.; PENITENTI, M.; IKOMA, M. R. V.;  
25 TSUNEMI, M. H.; PAPA, F. O.; LOPES, M. D. Cryoprotective effect of different glycerol  
26 concentrations on domestic cat spermatozoa. **Theriogenology**, v. 80, n. 7, p. 730–  
27 737, 2013.
- 28 VILLAVERDE, A. I. S. B.; MELLO, C. M.; MARTIN, I.; FERREIRA, T. H.; PAPA, F. O.;  
29 TACONELI, C. A.; LOPES, M. D. Comparison of efficiency between two artificial  
30 insemination methods using frozen – thawed semen in domestic cat ( *Felis catus* )  
31 Artificial insemination in domestic cats. **Animal Reproduction Science**, v. 114, p.

- 1 434–442, 2009.
- 2 VIRTANEN, R.; SAVOLA, J.; SAANO, V.; NYMAN, L. Characterization of the  
3 selectivity , specificity and potency of medetomidine as an  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist.  
4 **European Journal of Pharmacology**, v. 150, p. 9–14, 1988.
- 5 VIZUETE, G.; JIMÉNEZ, E.; AGÜERA, E. I.; PÉREZ-MARÍN, C. C. Impact of ultra-  
6 rapid freezing on the motility, morphology, viability and acrosome integrity of  
7 epididymal cat sperm diluted in sucrose-based extenders. **Reproduction in Domestic**  
8 **Animals**, v. 49, n. 1, p. 5–8, 2014.
- 9 WILDT, D. E.; RALL, W. F.; CRITSER, J. K.; MONFORT, S. L.; SEAL, U. S. Genome  
10 resource banks: Living collections for biodiversity conservation. **BioScience**, v. 47, n.  
11 10, p. 689–698, 1997.
- 12 WILDT DE; BUSH, M.; HOWARD, J. G.; O'BRIEN, S. J.; MELTZER, D.; VAN DYK, A.;  
13 EBEDES, H.; BRAND, D. J. Unique seminal quality in the South African cheetah and  
14 a comparative evaluation in the domestic cat. **Biology of Reproduction**, v. 29, p.  
15 1019–1025, 1983.
- 16 YÁNIZ, J. L.; SILVESTRE, M. A.; SANTOLARIA, P.; SOLER, C. CASA-Mot in  
17 mammals: An update. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 30, n. 6, p. 799–  
18 809, 2018.
- 19 YONG, K.; SAFWANI, W.; XU, F.; ZHANG, X.; CHOI, J.; ABAS, W.; OMAR, S.; MAN.,  
20 A.; CHUA, K.; PINGGUAN-MURPHY, B. Assessment of tumourigenic potential in long-  
21 term cryopreserved human adipose-derived stem cells. **Journal of Tissue**  
22 **Engineering and Regenerative Medicine**, v. 11, n. 8, p. 2217–2226, 2017.
- 23 ZAMBELLI, D.; CUNTO, M. Semen collection in cats: Techniques and analysis.  
24 **Theriogenology**, v. 66, n. 2, p. 159–165, jul. 2006. Disponível em:  
25 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X06000616>>.
- 26 ZAMBELLI, D.; PRATI, F.; CUNTO, M.; IACONO, E.; MERLO, B. Quality and in vitro  
27 fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization  
28 after medetomidine administration. **Theriogenology**, v. 69, p. 485–490, 2008.

1 ZAMBELLI, D.; RACCAGNI, R.; CUNTO, M.; ANDREANI, G.; ISANI, G. Sperm  
2 evaluation and biochemical characterization of cat seminal plasma collected by  
3 electroejaculation and urethral catheterization. **Theriogenology**, v. 74, n. 8, p. 1396–  
4 1402, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.011>>.

5 ZHOU, R.; WU, J.; LIU, B.; JIANG, Y.; CHEN, W.; LI, J.; HE, Q.; HE, Z. The roles and  
6 mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis. **Cellular  
7 and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 14, p. 2681–2695, 2019. Disponível em:  
8 <<https://doi.org/10.1007/s00018-019-03101-9>>.

9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

#### 1 **4 HIPÓTESE**

2                                   O tempo de aplicação da dexmedetomidina tem impacto direto na  
3 colheita e qualidade espermática. Além disso, a concentração da proteína flagelar  
4 proAKAP4 tem relação com os parâmetros indicativos de fertilidade (cinética/  
5 morfologia e integridade de membrana) e pode auxiliar/beneficiar na preservação de  
6 felinos domésticos.

7

## 1 5 OBJETIVOS

### 2 5.1 OBJETIVO GERAL

3 Avaliar o impacto do tempo de aplicação da dexmedetomidina na  
4 colheita e qualidade espermática e avaliar a relação da concentração da proAKAP4  
5 sobre os parâmetros de cinética, morfologia e integridade de membrana plasmática  
6 em espermatozoides ejaculados e epididimários pós-descongelação.

7

### 8 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

9 Avaliar o tempo de aplicação da dexmedetomidina na colheita e  
10 qualidade espermática.

11 Avaliar a cinética espermática por meio do sistema CASA, de  
12 espermatozoides ejaculados e epididimários pós descongelação;

13 Avaliar a morfologia e integridade de membrana plasmática de  
14 espermatozoides ejaculados e epididimários pós descongelação, por meio da  
15 microscopia óptica;

16 Quantificar a proteína PROAKAP4 em espermatozoides ejaculados e  
17 epididimários criopreservados, por meio do Kit Elisa (Cat 4MID® kit).

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

## 1 6 ARTIGO A



Received: 5 April 2023 | Revised: 23 June 2023 | Accepted: 27 June 2023

DOI: 10.1111/rda.14420

## ORIGINAL ARTICLE

Reproduction in Domestic Animals | WILEY

## Comparison of two pharmacological semen collection times with $\alpha$ 2-adrenergic agonist in domestic cats

Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo | Ana Beatriz Marques de Almeida |  
Leticia Amanda dos Santos Silva | Julia Rodrigues Gregghi | Vinícius Wagner Silva |  
Natália Ribeiro Sambatti | Luiz Guilherme Corsi Trautwein | Maria Isabel Mello Martins

Laboratório de Andrologia e Reprodução  
Animal Assistida – LARAA, Londrina,  
Paraná, Brazil

**Correspondence**

Maria Isabel Mello Martins, Laboratório de  
Andrologia e Reprodução Animal Assistida  
– LARAA, Londrina, Paraná, Brazil.  
Email: [imartins@uel.br](mailto:imartins@uel.br)

**Abstract**

The use of  $\alpha$ 2-adrenergic agonists in association with urethral catheterization has been used as a technique for pharmacological semen collection in cats. The mechanism of action of this drug is the stimulation of adrenoreceptors in the vas deferens, which results in ejaculation. While medetomidine is the  $\alpha$ 2-agonist most commonly used in studies, ejaculation with the use of dexmedetomidine associated with ketamine has been effective, but with variable results. Therefore, further studies regarding the methodology of use are required to obtain better seminal quality. This study aimed to compare two pharmacological semen collection times after the association of dexmedetomidine (30  $\mu$ g/kg, IM; Dormitor®, Zoetis), ketamine (5 mg/kg, IM; ketamine, Vetnil) and urethral catheterization using a tomcat probe (0.8 mm  $\times$  1.00 mm  $\times$  11 cm). The collections were divided into two experimental groups: G10 ( $N=8$ ; urethral catheterization after 10 min of anaesthesia) and G15 ( $N=8$ ; urethral catheterization after 15 min of anaesthesia). The ejaculates were evaluated for ejaculate volume, sperm concentration, morphology and kinetics using the CASA system. To compare the groups, the  $t$ -test and the Mann–Whitney  $U$ -test were used with a significance level of 5%. It was identified that ejaculate volume (G10:  $22.62 \pm 2.13$  vs. G15:  $26.81 \pm 1.55$ ;  $p < .001$ ) and sperm concentration (G10:  $48.10 \times 10^6 \pm 17.84$  vs. G15:  $90.18 \times 10^6 \pm 19.35$ ;  $p < .001$ ) was higher in G15 than in G10 and had a lower percentage of minor defects than G10 (G10:  $3.12 \pm 2.41$  vs. G15:  $1.00 \pm 1.19$ ;  $p = .043$ ). Regarding the kinetic parameters, the results of G15 were better for total motility—TM (G10:  $67.00 \pm 10.33$  vs. G15:  $81.87 \pm 7.99$ ;  $p = .006$ ) and faster cells—RAPID: (G10:  $55.00 \pm 16.63$  vs. G15:  $74.25 \pm 11.94$ ;  $p = .019$ ); whereas a higher proportion of cells with slow speed—SLOW were seen in G10 (G10:  $31.00 \pm 12.07$  vs.  $17.12 \pm 7.53$ ;  $p = .015$ ). Based on these findings, we suggest that collection via urethral catheterization should be performed 15 min after the application of ketamine-associated dexmedetomidine to obtain a better-quality ejaculate.

**KEYWORDS**

cats, dexmedetomidine, ejaculation

## 1 | INTRODUCTION

In recent years, growth in the breeding of domestic cats as pets has aroused interest in commercial catteries for the services of andrological evaluation and artificial insemination (AI) to improve the selection of breeding cats (Stornelli & Stornelli, 2001). It is also expected to aid in seeking assistance for the reproduction of males with difficulties performing natural mating (Johnson, 2018). At the same time, the domestic cat assumes the role of an experimental model, allowing the improvement of biological and reproductive processes for application in wild felines (Chatdarong, 2017; Luvoniet al., 2003; Prochowska & Nizański, 2017).

Semen collection is the first step in the application of assisted reproduction biotechniques, and in felines, it presents many challenges (Lueders et al., 2012; Zambelli et al., 2008) as the volume of the ejaculate is low and the collected sample needs to be sufficiently preserved for sperm analysis, insemination or cryopreservation (Johnson, 2018). Among the options for semen collection in cats, electroejaculation is the most commonly applied technique, but it does not always yield satisfactory results because samples are diluted with low sperm concentrations and occasionally contaminated with urine (Zambelli et al., 2007). Another factor to be considered is that the electrical stimulation characteristic of electroejaculation excites the animal, requiring the use of higher anaesthetic doses to guarantee analgesia and the safety of the team. Thus, the improvement of more practical semen collection techniques is of great value in the development of assisted animal reproduction programmes (De Araujo et al., 2018). A method that is currently being developed for domestic and wild felines is pharmacological collection associated with urethral catheterization (De Araujo et al., 2018; Lueders et al., 2012; Swanson et al., 2017; Zambelli et al., 2008). This is because it yields a seminal quality similar to that of other techniques (De Araujo et al., 2018). Pharmacological collection consists of introducing a *Tomcat* probe into the penile urethra after sedation of the animal using  $\alpha$ -adrenergic agents (detomidine, medetomidine or dexmedetomidine) that act on  $\alpha$ -adrenoreceptors resulting in the contraction of the vas deferens, this induces a high concentration of spermatozoa to be spontaneously released into the urethra, making it possible to collect semen without complete ejaculation (De Araujo et al., 2018; Dong-hyuk et al., 2018; Swanson et al., 2017; Zambelli et al., 2008, 2010).

Two  $\alpha$ 2-adrenergic agonists are routinely used: medetomidine and dexmedetomidine. Medetomidine is known to be a potent  $\alpha$ 2-adrenergic agonist that promotes sedation, analgesia and muscle relaxation (Duque et al., 2013; Nasrallah et al., 2014). However, its use in high doses carries the risk of cardiovascular side effects, which may make its use unfeasible in some animals (Romagnoli et al., 2015). Thus, studies with dexmedetomidine advance as a safer drug, as it presents similarities in terms of sedation and analgesia, and presents greater specificity for  $\alpha$ 2-receptors at lower doses (Swanson et al., 2017). Furthermore, it allows synergism with other anaesthetic drugs, providing a lower incidence of side effects and minimal respiratory depression. Another advantage is having a specific

reverser, atipamezole (Bagatini et al., 2002; Gertler et al., 2001; Lima & Rodrigues, 2011).

With the need for efficient pharmacological collection techniques using an  $\alpha$ 2-adrenergic agonist and high-quality semen, this study aims at evaluating and comparing, in two times, the effects of dexmedetomidine as an  $\alpha$ 2-adrenergic agonist associated with ketamine in the chemical induction of ejaculation obtained via urethral catheterization in domestic cats. The quality of the semen obtained was also evaluated.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Ethical aspects

The study was conducted according to the requirements of the Ethics Committee for Animal Use of the State University of Londrina (protocol no. 013.2020).

### 2.2 | Animals

A total of 16 privately owned adult mixed breed male cats between 1 and 3 years old, with an average weight of  $4.02 \pm 0.69$  kg were enrolled in this study. All males were companion animals, had no reproductive interest and were not conditioned to semen collections. Furthermore, males underwent clinical examinations and were enrolled in the study only if healthy, with normal testicular descent and penile/preputial gross morphology and with visible penile spines, as evidence of pubertal condition. In addition, the tutors were informed about the study objective and were instructed to keep the males at home and with no access to the street for at least 2 days before the pharmacological semen collection procedure.

### 2.3 | Semen collection

For semen collection via urethral catheterization, the animals were fasted from food for 12 h and fasted from water for 6 h before being anesthetized with dexmedetomidine (30  $\mu$ g/kg, Dexdormitor®, Zoetis, Orion Pharma) associated with ketamine (5 mg/kg, Syntec® 10%, São Paulo, Brazil). The animals were divided into two groups: G10 ( $N = 8$ ; urethral catheterization after 10 min of anaesthesia) and G15 ( $N = 8$ ; semen collection performed after 15 min of anaesthesia). Semen collection was performed using a sterile probe with a frontal opening without a side window (1.0 mm  $\times$  13.0 cm; Provar®, Provar Ltda) inserted into the penile urethra to a depth of 7–9 cm, allowing the probe to be filled with semen using capillarity (Figure 1). After obtaining the sample, the probe was removed, and the sample was deposited in a previously heated polypropylene plastic tube (1.5 mL). From this, TRIS-yolk extender (citric acid, 20% egg yolk, Equex glucose and amikacin) was added and the mixture was



**FIGURE 1** The urethral probe of a domestic feline with semen recovery via capillary action (arrow).

catheterization by the same experienced operator. At the end of the procedure, anaesthesia was reversed using atipamezole hydrochloride (0.25 mg/kg, Antisedan®, Zoetis, Orion Pharma). Until full recovery from anaesthesia, all cats were left undisturbed and placed in a single awakening cat cage, equipped with heating blankets.

### 1.1 | Infrared thermography

The testicular thermographic evaluation was performed using FLIR® C3 equipment, with the cats in dorsal decubitus after anaesthesia. To standardize the images, a distance of 60 cm was maintained between the camera and the testicles, with a room temperature of 23–25°C. To calculate the mean testicular temperature, the images were processed using *FLIR QuickReport®* software. All the evaluations were performed by the same technician.

### 1.2 | Sperm analysis

Sperm kinetic parameters were assessed using the CASA system (Hamilton Thorne, Ivos 14.0), with the following setup for feline species: fields acquired, 30; frames, 60 Hz; frame numbers, 5; minimum static contrast, 40; minimum cell size, 4 pixels; straightness (STR), thresholds 80%; VAP cut-off ( $\mu\text{m/s}$ ), 30; progressive minimum VAP ( $\mu\text{m/s}$ ), 70; VSL cut-off ( $\mu\text{m/s}$ ), 20; cell intensity, 50; and magnification, 1.89. To evaluate, a 3  $\mu\text{L}$  aliquot was placed on a CellVu® chamber (DRM-610, Millenium Sciences) and a 22  $\times$  22 cm coverslip (Kasvi®) previously heated to 37°C. The readings were performed in five randomly selected fields (ESHRE, 1998). The variables considered were total motility (TM, %), progressive motility (PM, %), average path velocity (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), straight-line velocity (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), curvilinear velocity (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), lateral head amplitude (ALH,  $\mu\text{m}$ ), beat cross frequency (BCF, Hz), straightness (STR, %) and linearity

**TABLE 1** Feline ejaculate volume, sperm concentration, spermatid morphology and plasma membrane integrity parameters (mean  $\pm$  standard deviation) in samples collected after 10 (G10) and 15 (G15) min of anaesthesia with dexmedetomidine associated with ketamine.

Parameters	Groups		p
	G10	G15	
Volume ( $\mu\text{L}$ )	22.62 $\pm$ 2.134	26.81 $\pm$ 1.557	<.001
Concentration ( $\times 10^6/\text{mL}$ )	48.10 $\pm$ 17.84	90.18 $\pm$ 19.35	<.001
Major defects (%)	23.75 $\pm$ 9.13	17.25 $\pm$ 9.2	.179
Minor defects (%)	3.12 $\pm$ 2.41	1.00 $\pm$ 1.19	.043
Total defects (%)	26.87 $\pm$ 7.86	18.25 $\pm$ 9.39	.066
Membrane integrity (%)	96.12 $\pm$ 2.58	94.75 $\pm$ 3.19	.360

(LIN, %). Four subpopulations were identified based on sperm velocity: fast (RAPID,  $\mu\text{m/s}$ ; %), medium (MEDIUM,  $\mu\text{m/s}$ ; %), slow (SLOW,  $\mu\text{m/s}$ ; %) and static (STATIC; sperm without movement, %). All these semen analyses were performed by the same technician.

For the analysis of spermatid membrane morphology and integrity, a smear was performed with 3  $\mu\text{L}$  of semen with 3  $\mu\text{L}$  of eosin/nigrosin supravital dye (BotuVital-Botupharma®, Botucatu) on a glassslide (Precision Glass Line). After 5 min, the reading was performed, with a count of 200 cells at 100 $\times$  magnification, under an optical microscope (Olympus®, CX31). Morphological changes were classified as either major or minor defects (CBRA, 2013). To evaluate plasma membrane integrity, the manufacturer's instructions were followed, in which spermatozoa stained in pink had damaged plasma membranes, and spermatozoa with no staining had intact plasma membranes. All the analyses were performed by the same technician.

### 1.3 | Statistical analysis

To compare the groups, a Student's *t*-test was performed using Sigma Plot 14.0, with the significance level at  $p < .05$ .

## 2 | RESULTS

The animals were randomly divided into groups, all animals were similar in age (G10: 1.62  $\pm$  0.69 vs. G15: 1.68  $\pm$  0.37;  $p = .574$ ), weight (G10: 3.98  $\pm$  0.79 vs. G15: 4.06  $\pm$  0.63;  $p = .827$ ) and body score (G10: 3.87  $\pm$  1.12 vs. G15: 3.75  $\pm$  0.70;  $p = .794$ ), being a homogeneous sample. In the thermographic examination, there was no difference in testicular temperature between groups (G10: 32.61  $\pm$  1.53 vs. G15: 31.51  $\pm$  0.85;  $p = .098$ ).

A higher volume ( $p < .001$ ) and sperm concentration ( $p < .001$ ) were identified in the G15 group, whereas in the G10 a higher

kinetics, G15 showed higher total motility (G10:  $67.00 \pm 10.33$  vs. G15:  $81.87 \pm 7.99$ ;  $p = .006$ ), and a higher percentage of cells with fast velocity (G10:  $55.00 \pm 16.63$  vs. G15:  $74.25 \pm 11.94$ ;  $p = .019$ ). In addition, there was a trend ( $p = .064$ ) of greater progressive motility in ejaculates collected after 15 min of anaesthesia than in those collected after 10 min. In contrast, G10 had the highest percentage of slow cells ( $p = .015$ ) (Table 2).

Regarding anaesthetic recovery, after the application of the dexmedetomidine reverser, atipamezole, each male was evaluated individually. No difference was identified in terms of anaesthetic recovery time (minutes) between the groups (G10:  $17.38 \pm 0.72$  vs. G15:  $18.18 \pm 0.86$ ;  $p = .064$ ).

## 1 | DISCUSSION

In the present study, different ejaculate volumes, sperm concentrations, motility parameters, percentages of fast and slow cells and minor defects were observed between the G15 and G10 groups, demonstrating the influence of the time after drug administration on sperm quality in ejaculates. Furthermore, our findings reinforce the effectiveness of dexmedetomidine for pharmacological semen collection.

In all cats, no side effects related to the drugs used were seen, and recovery was always fast and excellent, as previously reported by other researchers (Bruniges et al., 2016; Pisu et al., 2017; Tayari et al., 2015). Moreover, as described by Ko et al. (2009) and Pisu et al. (2017), in both groups, all the cats were standing within 20 min of atipamezole administration and none of the cats vomited.

Semen collection via urethral catheterization has been referenced in many studies after the administration of an  $\alpha 2$ -adrenergic agonist in

domestic and wild cats (De Araujo et al., 2018; Jelinkova et al., 2018; Madrigal-Valverde et al., 2021; Madrigal-Valverde et al., 2019; Prochowska et al., 2016; Silva et al., 2021; Swanson et al., 2017; Zambelli et al., 2010). In cats, as well as in other species, when an  $\alpha 2$ -adrenergic agonist is administered in association with ketamine, the  $\alpha 2$ -agonist antagonizes the muscle stiffness induced by ketamine, thereby smoothing the anaesthetic recovery. In turn, the sympathomimetic properties of ketamine counteract some of the undesirable cardiovascular effects (such as bradycardia) of  $\alpha 2$ -agonists by inducing short periods of anaesthesia and immobilization (Pawson, 2002).

Dexmedetomidine, the dextrorotatory enantiomer of medetomidine, is the prototype of  $\alpha 2$ -adrenergic agonists with greater binding specificity to  $\alpha 2$ -receptors but also binds to alpha-1 receptors. This drug has an  $\alpha 2:\alpha 1$  selectivity ratio of 1620:1 (Dyck et al., 1993; Rankin, 2017), which makes it similar to medetomidine but different from detomidine, which has the  $\alpha 2:\alpha 1$  receptor binding specificity ratio of 260:1 (Pawson, 2002; Rankin, 2017). However, although dexmedetomidine provides analgesia and sedation similarly to medetomidine, its effect is doubly potentiated compared to medetomidine.

The efficiency of dexmedetomidine as an ejaculation inducer was demonstrated in previous studies. A study carried out by Swanson et al. (2017), with a male housed within the institution's cat colony, indicated semen volume of 25  $\mu$ L, progressive motility parameters of 68.9% with 80% of acrosome integrity after 15 to 20 min of drug application (dexmedetomidine 25  $\mu$ g/kg, IM combined with ketamine 10 mg/kg BW, IM). Although housing conditions differed between studies, sperm quality results were similar. Likewise, Madrigal-valverde et al. (2021), in a study carried out with privately owned cats, reported a total motility of 81.25% (70%–90%), progressive motility of 75% (60%–85%) with plasma membrane integrity of 72% (64%–88%) and 71% of normal cells (53%–96%) when semen collection was performed

Parameters	Groups		
	G10	G15	p
TM (%)	67.00 $\pm$ 10.33	81.87 $\pm$ 7.99	.006
PM (%)	48.12 $\pm$ 15.49	61.50 $\pm$ 10.59	.064
VAP ( $\mu$ m/s)	111.47 $\pm$ 15.46	110.25 $\pm$ 10.63	.856
VSL ( $\mu$ m/s)	102.38 $\pm$ 16.04	97.41 $\pm$ 10.35	.473
VCL ( $\mu$ m/s)	155.62 $\pm$ 21.11	153.36 $\pm$ 8.93	.784
ALH ( $\mu$ m)	4.45 $\pm$ 0.39	4.38 $\pm$ 0.48	.781
BCF (Hz)	41.71 $\pm$ 4.05	41.63 $\pm$ 2.62	.966
STR (%)	90.12 $\pm$ 3.68	87.37 $\pm$ 2.20	.091
LIN (%)	65.75 $\pm$ 5.52	63.62 $\pm$ 6.90	.508
RAPID (%)	55.00 $\pm$ 16.63	74.25 $\pm$ 11.94	.019
MEDIUM (%)	10.62 $\pm$ 7.52	7.75 $\pm$ 4.59	.372
SLOW (%)	31.00 $\pm$ 12.07	17.12 $\pm$ 7.53	.015
STATIC (%)	3.25 $\pm$ 2.76	1.12 $\pm$ 0.64	.161

Abbreviations: ALH, lateral head amplitude; BCF, beat cross frequency; LIN, linearity; MEDIUM, sperm with medium velocity; PM, progressive motility; RAPID, sperm with fast velocity; SLOW, sperm with slow velocity; STATIC, static spermatozoa; STR, straightness; TM, total motility; VAP, average path velocity; VCL, curvilinear velocity; VSL, straight line velocity.

after 20 min of drug application (dexmedetomidine 25 µg/kg, IM combined with ketamine 5 mg/kg BW, IM). These findings were also similar to ours, however, the results of semen volume (about 33 µL) and sperm concentration (about  $181 \times 10^6$  spztz/mL) were higher compared to ours. Differently, Pisu et al. (2017), in a study carried out with client-owned purebred male and semen collection after 15 min of drug application (dexmedetomidine 5 µg/kg combined with methadone 0.2 mg/kg), reported semen volume (about 280 µL) and sperm concentration (about  $1823 \times 10^6$  spztz/mL), findings above the ones found in our study, however, total motility was of 61%, value below what was found in both of G10 (about 67%) and G15 (about 81%) groups. Although this finding is difficult to explain, it could be assumed that the use of purebred males in the study and/or the pharmacological interaction of the drugs used may have influenced sperm quality.

In the urogenital system, it is the stimulation of  $\alpha_2$ -receptors that promotes the relaxation of the vas deferens and urethral musculature (Muir & Hubbell, 2000; Virtanen et al., 1988), thereby releasing sperm into the urethra and allowing collection via urethral catheterization (Prochowska et al., 2015; Zambelli et al., 2008). Scrollavezza et al. (2009) demonstrated that the muscle relaxation effect was greater after 15 min of dexmedetomidine than after 10 min. Therefore, we can consider that the highest volume and concentration of spermatozoa identified in G15 can be explained by the action of dexmedetomidine, which reaches peak plasma concentration in 15 min (Dyck et al., 1993). This extended duration of drug action promotes a greater capacity for relaxation of the vas deferens and urethra, promoting the release of greater volume, sperm concentration and consequently a greater number of recovered sperm cells that can present good quality in sperm evaluation when compared to semen collection performed after 10 min (G10) of drug application. Cunto et al. (2015) reported that a higher dosage of the  $\alpha_2$ -adrenergic agonist (130 µg/kg medetomidine) guaranteed an adequate sedation, and that led to a higher quality of the semen in terms of volume, concentration, total number of spermatozoa and quality of the movement compared with a lower dose (50 µg/kg medetomidine). Moreover, sperm collected with lower  $\alpha_2$ -adrenergic agonist doses will most likely be less efficient in procedures such as in vivo fertilization and cryopreservation, therefore limiting its use to in vitro procedures only.

Despite the relevant results described by Cunto et al. (2015), we must consider that they used a high dose to achieve a good quality ejaculate. Therefore, our findings reinforce the efficiency of using dexmedetomidine in domestic cats. With only a quarter of the dose (30 µg/kg), it makes semen collection safer (Ko et al., 2009), allowing a reduction in the dose of anaesthetic used during the procedure and a consequent decrease in adverse effects. Moreover, when adequate sedation time is achieved, greater urethral relaxation occurs and, consequently, the release of a better-quality ejaculate, without the need for transrectal prostate massage, by digital touch, to stimulate the gland and sperm release into the urethra.

Similar to the literature, no study has investigated the influence of the time after dexmedetomidine administration on sperm quality. It is believed that this may be the first study to describe these findings in a pharmacological collection of domestic felines, and it can be amplified

for use with wild felines. Furthermore, this finding is relevant because, owing to the increase in ejaculate volume and sperm concentration with improvements in kinetic parameters, it is possible to preserve gametes with better quality, increase the number of straws subjected to cryo-preservation per animal, and increase the number of inseminated females, thereby contributing positively to assisted reproduction.

## 1 | CONCLUSION

Based on these findings, it is suggested that collection via urethral catheterization be performed 15 min after the application of a 30 µg/kg dose of dexmedetomidine, associated with 5 mg/kg ketamine, to obtain adequate muscle relaxation and a better-quality ejaculate.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

**Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo:** resources, data curation, project administration, investigation, writing—original draft and writing—review and editing; **Ana Beatriz Marques de Almeida:** project administration, methodology and supervision; **Leticia Amanda dos Santos Silva:** project administration and methodology; **Julia Rodrigues Greghi:** methodology; **Vinicius Wagner Silva:** methodology; **Natália Ribeiro Sambatti:** methodology; **Luiz Guilherme Corsi Trautwein:** methodology; **Maria Isabel Mello Martins:** project administration, investigation, supervision and writing—review and editing.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the scholarship presented to Hidalgo, M. M. T. They would also like to thank the Total Vet Distributor for their research support.

## CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflicts of interest.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## ORCID

Vinicius Wagner Silva  <https://orcid.org/0000-0001-8623-5131>

Maria Isabel Mello Martins  <https://orcid.org/0000-0001-8416-2450>

## REFERENCES

- Bagatini, A., Gomes, C. R., & Masella, M. Z. (2002). Dexmedetomidine: Farmacologia e uso clínico. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 52, 606–612.
- Bruniges, N., Taylor, P. M., & Yates, D. (2016). Injectable anaesthesia for adult cat and kitten castration: Effects of medetomidine, dexmedetomidine and atipamezole on recovery. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 18(11), 860–867.

- Chatdarong, K. (2017). Retained fertilizing capability in cryopreserved feline spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 52, 261–264. <https://doi.org/10.1111/rda.12855>
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). (2013). *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. (3rd ed.).
- Cunto, M., Kuster, D. G., Bini, C., Cartolano, C., Pietra, M., & Zambelli, D. (2015). Influence of different protocols of urethral catheterization after pharmacological induction (Ur. Ca. P. I.) on semen quality in the domestic cat. *Reproduction in Domestic Animals*, 50, 999–1002. <https://doi.org/10.1111/rda.12626>
- De Araujo, G. R., Antônio, T., De Paula, R., De Deco-souza, T., Morato, R. G., Bergo, L. C. F., Cruz, L., Costa, D. S., & Braud, C. (2018). Comparison of semen samples collected from wild and captive jaguars (*Panthera onca*) by urethral catheterization after pharmacological induction. *Animal Reproduction Science*, 195, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.12.019>
- Dong-hyuk, J., Jeong-ho, K., & Ki-jeong, N. (2018). Theriogenology characterization and cryopreservation of Amur leopard cats (*Prionailurus bengalensis euptilurus*) semen collected by urethral catheterization. *Theriogenology*, 119, 91–95. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.06.004>
- Duque, F. J., Dominguez-roland, J. M., Martinez-taboada, F., Macías-garcía, B., & Rodríguez-medina, P. (2013). Research in veterinary science effects of medetomidine and medetomidine-butorphanol transcranial color-coded duplex ultrasonography in healthy dogs. *Research in Veterinary Science*, 95(2), 648–653. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.04.010>
- Dyck, J. B., Maze, M., Haack, C., Vuoriolehto, L., & Shafer, S. L. (1993). The pharmacokinetics and hemodynamic effects of intravenous and intramuscular dexmedetomidine hydrochloride in adult human volunteers. *Anesthesiology*, 78(5), 813–820. <https://doi.org/10.1097/0000542-199305000-00002>
- European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). (1998). Andrology Special Interest Group. In *Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa* (pp. 142–145). Human Reproduction.
- Gertler, R., Brown, H. C., Mitchell, D. H., & Silvius, E. N. (2001). Dexmedetomidine: A novel sedative-analgesic agent. *BUMC*, 14, 13–21.
- Jelinkova, K., Vitasek, R., Novotny, R., & Bartoskova, A. (2018). A comparison of quality parameters of fresh feline ejaculates collected by three different collection techniques. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(5), 1068–1074. <https://doi.org/10.1111/rda.13205>
- Johnson, A. K. (2018). Assisted reproduction in the male cat. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 48(4), 511–521. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2018.02.001>
- Ko, J. C., Knesl, O., Weil, A. B., Raffae, M., & Inoue, T. (2009). FAQs—analgesia, sedation, and anesthesia. Making the switch from medetomidine to dexmedetomidine. *Compendium Continuing Education for Veterinarians*, 31(suppl 1A), 1–24.
- Lima, I. F., & Rodrigues, R. B. (2011). Dexmedetomidine: Uses in pediatric and potential neuroprotective effect in newborns. *Revista Médica de Minas Gerais*, 21(4), 27–37.
- Lueders, I., Luther, I., Scheepers, G., & Van der Horst, G. (2012). Improved semen collection method for wild felids: Urethral catheterization yields high sperm quality in African lions. *Theriogenology*, 78(3), 696–701. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.02.026>
- Luvoni, G. C., Kalchschmidt, E., Leoni, S., & Ruggiero, C. (2003). Conservation of feline semen: Part I: Cooling and freezing protocols. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 5, 203–208. [https://doi.org/10.1016/S1098-612X\(03\)00029-9](https://doi.org/10.1016/S1098-612X(03)00029-9)
- Madrigal-Valverde, M., Bittencourt, R. F., Ribeiro Filho, A. L., Lents, M. P., Azevedo, M. C., Barreto, R. O., Teixeira, N. A., Mattos, P. M. S., Curvelo, V. P., Gomes, M. C., Dantas, V., Araújo, G. R., & Valverde-Abarca, A. (2019). Biometría testicular y características seminales en felinos neotropicales (Carnivora: Felidae) sometidos a cateter-ismo uretral. *Revista de Biología Tropical*, 67(4), 975–988. <https://doi.org/10.15517/rbt.v67i4.36224>
- Madrigal-valverde, M., Bittencourt, R. F., Ribeiro Filho, A. D. L., Barbosa, V. F., Vieira, C. A., Romão, E. A., Carneiro, I. B., Azevedo, M. C., & Araujo, G. R. (2021). Quality of domestic cat semen collected by urethral catheterization after the use of different alpha 2-adrenergic agonists. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 23(8), 745–750. <https://doi.org/10.1177/1098612X20973183>
- Muir, W. W., & Hubbell, J. (2000). *Handbook of veterinary anesthesia*. 3rd ed. Mosby.
- Nasrallah, F. A., Kang, S., Low, A. S., & Chuang, K. (2014). NeuroImage Neural correlate of resting-state functional connectivity under  $\alpha$  2 adrenergic receptor agonist, medetomidine. *NeuroImage*, 84, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.08.004>
- Pawson, P. (2002). Sedatives. In J. Maddison, S. Page, & D. Church (Eds.), *Small animal clinical pharmacology*. 2nd ed. (pp. 101–114). Saunders Elsevier
- Pisu, M. C., Ponzio, P., Rovella, C., Baravalle, M., & Veronesi, M. C. (2017). Usefulness of an injectable anaesthetic protocol for semen collection through urethral catheterisation in domestic cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 19(10), 1087–1090. <https://doi.org/10.1177/1098612X16679589>
- Prochowska, S., & Nizański, W. (2017). In vitro fertilizing potential of urethral and epididymal spermatozoa collected from domestic cats (*Felis catus*). *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 20(1), 19–24. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2017-0003>
- Prochowska, S., Nizański, W., Malgorzata, O., & Partyka, A. (2015). Characteristics of urethral and epididymal semen collected from domestic cats—a retrospective study of 214 cases. *Theriogenology*, 84, 1565–1571. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.08.005>
- Prochowska, S., Nizański, W., & Partyka, A. (2016). Comparative analysis of in vitro characteristics of fresh and frozen-thawed urethral and epididymal spermatozoa from cats (*Felis domesticus*). *Theriogenology*, 86(8), 2063–2072. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.07.002>
- Rankin, D. C. (2017). Sedativos e tranquilizantes. In *Lumb & Jones. Anestesiologia e analgesia em veterinária*. 5th ed. (pp. 188–198). Roca.
- Romagnoli, N., Zambelli, D., Cunto, M., Ventrella, D., & Toaldo, M. B. (2015). Non-invasive evaluation of the haemodynamic effects of high-dose medetomidine in healthy cats for semen collection. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 18(4), 337–343. <https://doi.org/10.1177/1098612X15583345>
- Scrollavezza, P., Tambella, A. M., Vullo, C., & Piccionello Palumbo, A. (2009). Evaluation of the muscular relaxant effect of dexmedetomidine or medetomidine in cats. *Veterinary Research Communications*, 33(1), 213–215. <https://doi.org/10.1007/s11259-009-9271-y>
- Silva, M. C. C., Ullony, K. M., de Araújo, G. R., Jorge-Neto, P. N., Albuquerque, V. B., Caramalac, S. M., de Oliveira, A. R., Zanella, R., Marques, M. G., Csemak-Junior, A. C., Luczinski, T. C., de Oliveira Frazílio, F., da Costa e Silva, E. V., & De Deco-Souza, T. (2021). Can detomidine replace medetomidine for pharmacological semen collection in domestic cats? *Animal Reproduction*, 18(2), 1–7. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2021-0017>
- Stornelli, M. C., & Stornelli, M. A. (2001). *Evaluación, Criopreservación de Semen e Inseminación Artificial en el Gato Doméstico*. Asociación Argentina de Medicina Felina.
- Swanson, W. F., Bateman, H. L., & Vansandt, L. M. (2017). Urethral catheterization and sperm vitrification for simplified semen banking in felids. *Reproduction in Domestic Animals*, 52, 255–260. <https://doi.org/10.1111/rda.12863>

- Virtanen, R., Savola, J., Saano, V., & Nyman, L. (1988). Characterization of the selectivity, specificity and potency of medetomidine as an  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist. *European Journal of Pharmacology*, *150*, 9–14.
- Zambelli, D., Cunto, M., Prati, F., & Merlo, B. (2007). Effects of ketamine or medetomidine administration on quality of electroejaculated sperm and on sperm flow in the domestic cat. *Theriogenology*, *68*, 796–803. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.06.008>
- Zambelli, D., Prati, F., Cunto, M., Iacono, E., & Merlo, B. (2008). Quality and in vitro fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration. *Theriogenology*, *69*, 485–490. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.10.019>
- Zambelli, D., Raccagni, R., Cunto, M., Andreani, G., & Isani, G. (2010). Sperm evaluation and biochemical characterization of cat seminal plasma collected by electroejaculation and urethral catheterization.

*Theriogenology*, *74*(8), 1396–1402. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.011>

1 **6ARTIGO B** – Artigo nos moldes da revista *Reproduction in Domestic Animals*:

2 <https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/14390531/homepage/forauthors.html>

3

4 **Relationship of proAKAP4 concentration in cryopreserved ejaculated and epididymal**  
5 **spermatozoa of Tomcat**  
6

7 **Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo<sup>1</sup>, Ana Beatriz Marques de Almeida<sup>1</sup>, Leticia**  
8 **Amanda dos Santos Silva<sup>1</sup>, Natália Ribeiro Sambatti<sup>1</sup>, Luiz Guilherme Corsi**  
9 **Trautwein<sup>1</sup>, João Carlos Pinheiro Ferreira<sup>2</sup>, Maria Isabel Mello Martins<sup>1\*</sup>**

10

11 <sup>1</sup>LARAA- Laboratory of Andrology and Assisted Animal Reproduction- State University of  
12 Londrina (UEL), Londrina, PR, Brazil; <sup>2</sup>Department of Veterinary Surgery and Animal  
13 Reproduction - School of Veterinary Medicine and Animal Science- Sao Paulo State  
14 University – UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil. \*E-mail: imartins@uel.br

15

16

17

18

Abstract

19 The AKAP4 protein is the most abundant protein of the sperm fibrous sheath. This protein is  
20 considered instrumental in regulating sperm flagellum motion and its precursor, proAKAP4, is  
21 considered a biomarker for sperm quality. Therefore, this study aimed to evaluate the  
22 relationship of the proAKAP4 concentration on sperm kinetics, morphology and membrane  
23 integrity of cryopreserved ejaculated and epididymal spermatozoa. A total of fifteen adult  
24 mixed breed male cats between 1 and 3 years, with a mean weight of  $4.21 \pm 0.55$  kg were  
25 included in this study. The first step of the study involved semen collection by urethral  
26 catheterization, using a sterile probe. In the second step, after elective orchietomy, sperm were  
27 recovered from the epididymis. The samples were cryopreserved in TRIS-yolk extender.  
28 Thawed sperm straws were analysed to sperm kinetics, morphology and plasma membrane  
29 integrity. Sperm proAKAP4 concentration was determined using a commercial proAKAP4  
30 ELISA kit. The relationship between the proAKAP4 concentrations and the sperm kinetics were  
31 evaluated by linear regressions, considering the proAKAP4 concentrations as independent  
32 variable and kinetics parameters as dependent variable. To compare concentration of  
33 proAKAP4 protein in both collection methods, paired t test was used ( $P < 0.05$ ). Comparing  
34 proAKAP4 concentrations in ejaculated and epididymal spermatozoa, it was observed that the  
35 mean of proAKAP4 in ejaculated spermatozoa were higher,  $30.43 \pm 3.45$  ng/mL ( $15.26$ - $59.18$   
36 ng/mL) than epididymal spermatozoa  $20.51 \pm 1.87$  ng/mL ( $12.15$ - $35.36$  ng/mL) ( $P = 0.004$ ). It  
37 was possible to observe the relationship between the proAKAP4 concentration and the  
38 parameters: TM ( $r^2 = 0.660$ ,  $P < 0.001$ ) and dance ( $r^2 = 0.266$ ,  $P = 0.049$ ) in ejaculated sperm.  
39 Also, it was observed relationship between the proAKAP4 concentration and TM ( $r^2 = 0.668$ ,  
40  $P < 0.001$ ) and the percentage of Static sperm cells ( $r^2 = 0.74$ ,  $P = 0.003$ ) in epididymis sperm.  
41 In conclusion, our study revealed a relationship of proAKAP4 concentrations and kinetic  
42 parameters in ejaculated and epididymal spermatozoa post-cryopreservation. Therefore, we  
43 concluded that the proAKAP4 is a suitable biomarker to predict feline sperm motility.

44 **Keywords:** Elisa kit, feline, semen, epididymis.

45

## 1 **1 Introduction**

2

3

Conventional semen analyzes are commonly used to predict male reproductive capacity.

4

However, fertilization success cannot be attributed only to absolute number of viable, motile or

5

morphologically normal sperm, but also to sperm functional competence (Almeida et al., 2022;

6

Carracedo et al., 2022; Kumar & Singh, 2021b; Sergeant et al., 2020).

7

In recent years, proteomic research has advanced into sperm-specific processes,

8

allowing for a male fertility more accurate assessment. Many protein biomarkers have been

9

identified that reveal differences between low and high semen quality and, consequently,

10

between infertile and fertile individuals (Almeida et al., 2022; Kumar & Singh, 2021a; Sergeant

11

et al., 2020).

12

AKAP4 protein (A-kinase 4 anchoring protein) and its precursor, proAKAP4, stand out

13

as the main structural and functional protein of the fibrous sperm sheath and are located in the

14

flagellum main part (Carracedo et al., 2022; Delehedde, Demouveau, et al., 2019; Dordas-

15

Perpinyà, Yanez-Ortiz, et al., 2022; Sergeant et al., 2019). The fibrous sheath influences the

16

flexibility degree, flagellar movement plane and flagellar beat type (Vijayaraghavan et al.,

17

1999). This scaffold protein is essential in the regulation of sperm flagellum movement and a

18

deletion of AKAP4, as described in male AKAP4 knockout mice, results in defective fibrous

19

sheath formation and flagellar dysplasia, resulting in infertility due to loss of motility and sperm

20

abnormalities (Fang et al., 2019; Miki et al., 2002).

21

A new methodology utilizing an ELISA test to assess proAKAP4 concentration in sperm

22

has been validated and demonstrated to be highly accurate in many species. Studies have

23

consistently shown a positive correlation between proAKAP4 protein levels and kinetic

24

parameters in dogs (Le Couazer et al., 2019), bulls (Almeida et al., 2022; Bastan & Akcay,

25

2021; Dordas-Perpinyà et al., 2022), stallions (Blommaert et al., 2019; Dordas-Perpinyà,

26

Yanez-Ortiz, et al., 2022), rams (Riesco et al., 2020) and dromedary (Malo et al., 2021).

1 Notably, proAKAP4 analysis via ELISA exhibits high sensitivity and accuracy and remains  
2 unaffected by proteins from seminal plasma or molecules from the extender (Sergeant et al.,  
3 2019).

4 Despite numerous publications on proAKAP4 in various species (Carracedo et al., 2022)  
5 only one study has assessed the proAKAP4 ELISA kit accuracy (4MID® Kits, 4BioDx, Lille,  
6 France) on ejaculated sperm from domestic cats. However, the findings did not reveal any  
7 correlation between proAKAP4 levels and sperm kinetics, prompting the authors to suggest  
8 further investigations in this species.

9 Therefore, this study aimed to evaluate the relationship of proAKAP4 concentration on  
10 kinetic parameters, sperm morphology and membrane integrity in cryopreserved ejaculated and  
11 epididymal sperm of Tomcat.

12

## 13 **2 Material and Methods**

### 14 *2.1. Ethical aspects*

15 The study was conducted according to the requirements of the Ethics Committee for  
16 Animal Use of the State University of Londrina (protocol no. 013.2020).

### 17 *2.2. Animals and experimental design*

18 Fifteen privately owned adult mixed breed male cats between 1 and 3 years, with a mean  
19 weight of  $4.21 \pm 0.55$  kg were included in this study. All males were companion animals, no  
20 reproductive interest and were not conditioned to semen collections. Furthermore, males  
21 underwent clinical examinations, and were enrolled in the study only if healthy, with normal  
22 testicular descent and penile/preputial gross morphology, and with visible penile spines, as  
23 evidence of pubertal condition. In addition, tutors were informed about the study objective and  
24 were instructed to keep the males at home and no street access for at least two days before the  
25 pharmacological semen collection procedure.

1           On the first day, with the male sedated, the ejaculate was collected by urethral  
2 catheterization, diluted in TRIS-yolk extender (citric acid, 20% egg yolk, Equex glucose, and  
3 amikacin), evaluated (sperm kinetics, sperm morphology and membrane integrity) and  
4 cryopreserved. After 48 hours, the males underwent orchiectomy, the sperm was recovered of  
5 epididymis tail, diluted in TRIS-yolk extender (citric acid, 20% egg yolk, Equex glucose, and  
6 amikacin), evaluated (sperm kinetics, sperm morphology and membrane integrity) and  
7 cryopreserved. After thawing samples from both sperm collection methods, sperm analyzes  
8 (sperm kinetics, sperm morphology and membrane integrity) and proAKAP4 quantification  
9 were performed (Figure 1).

### 10 *2.3. Infrared thermography*

11           For a supplementary clinical assessment, testicular infrared thermography was  
12 employed to exclude any potential alterations in the testicle temperature that might impact the  
13 investigation. The assessment of testicular thermography was conducted utilizing FLIR® C3  
14 equipment (Boston, MA, USA), with the felines positioned in dorsal decubitus post-anesthesia.  
15 To standardize the images, a distance of 60 cm was maintained between the camera and the  
16 testicles, with an room temperature of 23–25°C (Schnitzer et al., 2022; Hidalgo et al., 2023)  
17 The mean testicular temperature was computed by processing the images through FLIR  
18 QuickReport ® software. All the evaluations were performed by the same technician.

### 19 *2.4. Sample collection*

#### 20 *2.4.1 Urethral catheterization*

21           For semen collection via urethral catheterization, the animals were fasted from food for  
22 12 hours and fasted from water for six hours before being anesthetized with dexmedetomidine  
23 (30 µg/kg, Dexdormitor®, Zoetis, Orion Pharma, Brazil) associated with ketamine (5 mg/kg,  
24 Syntec® 10%, São Paulo, Brazil). Semen collection was performed, after 15 minutes of

1 anesthesia, using a Tomcat urethral catheter with a frontal opening without a side window (1.0  
2 mm x 13.0 cm; Provar®, Provar Ltda, São Paulo, Brazil) inserted into the penile urethra to a  
3 depth of 7–9 cm, allowing the catheter to be filled with semen using capillarity (Hidalgo et al.,  
4 2023). After obtaining the sample, the catheter was removed, and the sample was deposited in  
5 a previously heated polypropylene plastic tube (1.5 mL), TRIS-yolk extender (citric acid, 20%  
6 egg yolk, Equex glucose, and amikacin) with 7% glycerol was added and the mixture was kept  
7 at room temperature (23-25°C). Semen was collected via urethral catheterization by the same  
8 experienced operator. At the end of the procedure, anesthesia was reversed using atipimezole  
9 hydrochloride (0.25 mg/kg, Antisedan®, Zoetis, Orion Pharma, Brazil).

#### 10 *2.4.2 Recovering of epididymal tail spermatozoa*

11 48 hours after sperm collection by urethral catheterization, the felines underwent  
12 elective orchiectomy for recovering of epididymal tail spermatozoa. For that, an association of  
13 12 mg/kg ketamine (Cetamin - Syntec®, Brazil), 0.3 mg/kg midazolam (DORMire® -  
14 Cristália®, Brazil), 3 mg/kg Pethidine (União Química®, Brazil) were used for a dissociative  
15 anesthesia.

16 After orchietomy, the testicles were immediately processed. The vas deferens was  
17 dissected from the blood vessels, and the sperm was collected by squeezing epididymal tail and  
18 ductus deferens with aid of hemostatic clamp. The recovered sperm were placed in a Petri dish  
19 containing 200 µL of pre-heated TRIS-yolk extender (citric acid, 20% egg yolk, Equex glucose,  
20 and amikacin). The sample was homogenized, transferred to an Eppendorf tube (1.5 mL) for  
21 analysis.

#### 22 *2.5. Sperm analysis*

23 Sperm kinetic parameters, for both sperm collection methods, were assessed using the  
24 CASA system (Hamilton Thorne,IVOS 14.0, Beverly, MA, USA), with the following setup for

1 feline species: fields acquired, 30; frames, 60 Hz; frame numbers, 5; minimum static contrast,  
2 40; minimum cell size, 4 pixels; straightness (STR), thresholds 80%; VAP cut-off ( $\mu\text{m/s}$ ), 30;  
3 progressive minimum VAP ( $\mu\text{m/s}$ ), 70; VSL cut-off ( $\mu\text{m/s}$ ), 20; cell intensity, 50; and  
4 magnification, 1.89. To evaluate, 3  $\mu\text{L}$  aliquot was placed on a CellVu® chamber (DRM-610,  
5 Millenium Sciences, New York, USA) and a 22  $\times$  22 cm coverslip (Kasvi®, Curitiba, Brazil)  
6 previously heated to 37°C. The readings were performed in five randomly selected fields  
7 (ESHRE, 1998). The variables considered were total motility (TM, %), progressive motility  
8 (PM, %), average path velocity (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), straight-line velocity (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), curvilinear  
9 velocity (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), lateral head amplitude (ALH,  $\mu\text{m}$ ), beat cross frequency (BCF, Hz),  
10 straightness (STR, %), and linearity (LIN, %). Four subpopulations were identified based on  
11 sperm velocity: fast (RAPID,  $\mu\text{m/s}$ ; %), medium (MEDIUM,  $\mu\text{m/s}$ ; %), slow (SLOW,  $\mu\text{m/s}$ ;  
12 %), and static (STATIC; sperm without movement, %). For sperm velocity index (SVI) and  
13 sperm movement index (SMI) calculation, formulas described by Núñez-Martínez et al. (2006)  
14 were used. All the semen analyses were performed by the same technician.

15 For sperm morphology and membrane integrity analyses, in both sperm collection  
16 methods, smear was performed with 3  $\mu\text{L}$  of semen with 3  $\mu\text{L}$  of eosin/nigrosin supravital dye  
17 (BotuVital-Botupharma®, Botucatu, SP, Brazil) on a glass slide (Precision Glass Line). After 5  
18 minutes, the reading was performed, with a count of 200 cells at 100x magnification, under an  
19 optical microscope (Olympus®, CX31, Tokyo, Japan). Morphological changes were classified  
20 as either major or minor defects (CBRA, 2013). To evaluate plasma membrane integrity, the  
21 manufacturer's instructions were followed, in which spermatozoa stained pink had damaged  
22 plasma membranes, and spermatozoa with no staining had intact plasma membranes. All the  
23 analyses were performed by the same technician.

## 24 *2.6 Sample Cryopreservation*

1           After collection and evaluation of ejaculated and epididymal spermatozoa (kinetic  
2 parameters, sperm morphology and membrane integrity), the final sperm concentration was  
3 adjusted to  $20 \times 10^6$  spermatozoa/mL, sperm samples were placed in French straws (250 $\mu$ L)  
4 and sealed with polyvinyl alcohol. The samples were cooled to 4°C within 2 hours and placed  
5 6 cm above the liquid nitrogen surface for 20 minutes. The straws were then plunged into liquid  
6 nitrogen and stored at -196°C in cryotank until evaluation. Samples were thawed at 37°C for  
7 30s by immersion in a 37°C water bath for 30 s. The post-thaw semen analysis followed the  
8 same procedures as used for the fresh samples. All the analyses were performed by the same  
9 technician.

#### 10 *2.7 Measurement of proAKAP4 concentration*

11           Ejaculate and epididymal sperm proAKAP4 concentration was determined using a  
12 commercial proAKAP4 ELISA kit (Cat 4MID® kit, 4BioDx, Lille, France), according to  
13 instructions provided by the manufacturer. Since this commercial kit presents accuracy (high  
14 sensibility and high specificity) (Dordas-Perpinyà, Yanez-Ortiz, et al., 2022; Sergeant et al.,  
15 2019), only one analysis per sample was conducted. Briefly, 40  $\mu$ L of each frozen-thawed sperm  
16 sample was added to a microtube with the assay lysis buffer (80 $\mu$ L). Then, 150  $\mu$ L lysed sperm  
17 was added to the plate pre-coated with proAKAP4 antibody and incubated at 24°C (room  
18 temperature) for 2 h. After washing, 100  $\mu$ L of detection antibody was added to each well and  
19 the plate was incubated for 1 h at 24°C on a horizontal shaker at 300 rpm. Then, the plate was  
20 covered with aluminium foil and incubated for 10 min at 24°C on a horizontal shaker at  
21 300 rpm. After that, 50  $\mu$ L of stop solution was added to each well, the plate was mixed for  
22 2 min on a horizontal shaker and then the absorbance was measured by spectrophotometry (450  
23 nm). The proAKAP4 concentrations were expressed as ng/mL.

#### 24 *2.8. Statistical analysis*

1           The data were submitted to Shapiro-Wilk and Levene tests to ensure their normal  
2 distribution and homogeneity, respectively. The ability of proAKAP4 concentration to predict  
3 sperm kinetics, sperm morphology, and membrane integrity in both sperm collection methods  
4 were evaluated by linear regressions, considering the proAKAP4 concentration as independent  
5 variable and others parameters as dependent variable. To compare concentration of proAKAP4  
6 in both sperm collection methods, paired t-test was used. Statistical analysis was performed  
7 using the Sigma Plot 14.0 software. All results were expressed as mean and SEM and  $P < 0.05$   
8 was considered significant.

### 9 **3 Results**

10           In the infrared thermographic evaluation, all animals presented testicular temperatures  
11 within normal parameters for the species ( $31.51 \pm 0.30$  °C), since testicular temperatures were  
12 4 to 6 °C below body temperature (Gabaldi & Wolf., 2002; kastelic et al., 1997). Therefore all  
13 animals were included in the study.

14           The results of the assessment of sperm concentration, sperm morphology, membrane  
15 integrity and sperm kinetics are presented in Table 1. There was no difference between sperm  
16 collection methods in terms of sperm morphology (major defects:  $P=0.563$ ; minor defects:  
17  $P=0.475$ ; total defects:  $P=0.756$ ) and membrane integrity ( $P=0.929$ ). However, there was a  
18 difference for some kinetic parameters such as VAP ( $P < 0.001$ ); VSL ( $P < 0.001$ ); VCL ( $< 0.001$ );  
19 ALH ( $P=0.008$ ); Dance ( $P < 0.001$ ); SMI ( $P < 0.001$ ); SVI ( $P < 0.001$ ); Medium cells ( $P < 0.001$ )  
20 and Static cells ( $P=0.036$ ).

21           In accordance with the obtained proAKAP4 concentrations values (measured by  
22 ELISA), ejaculated spermatozoa presented ( $P=0.004$ ) higher proAKAP4 concentration  $30.43 \pm$   
23  $3.45$  ng/mL ( $15.26$ - $59.18$  ng/mL) compared to epididymal spermatozoa  $20.51 \pm 1.87$  ng/mL  
24 ( $12.15$ - $35.36$  ng/mL) (Figure 2).

1 In linear regression analysis, a relationship was observed between the proAKAP4  
2 concentration on TM ( $r^2 = 0.660$ ,  $P < 0.001$ ; Figure 3A) and dance (VCL x ALH) ( $r^2 = 0.266$ ,  $P$   
3  $= 0.049$ ; Figure 3B) in ejaculate spermatozoa. Moreover, there was a relationship between the  
4 proAKAP4 concentration on TM ( $r^2 = 0.668$ ,  $P < 0.001$ ; Figure 3C) and the percentage of static  
5 sperm cells ( $r^2 = 0.363$ ,  $P = 0.017$ ; Figure 3D) in epididymis spermatozoa. However,  
6 proAKAP4 showed no relationship with other kinetics parameters provided by the CASA  
7 system (Table 1).

8 No relationship were observed between proAKAP4 concentrations and the percentage  
9 of minor (EJAC:  $P = 0.449$ , EPID:  $P = 0.671$ ), major (EJAC:  $P = 0.451$ , EPID:  $P = 0.286$ ), or total  
10 morphological defects (EJAC:  $P = 0.318$ , EPID:  $P = 0.361$ ) for ejaculate and epididymis  
11 spermatozoa. Furthermore, no relationship of proAKAP4 concentration with sperm membrane  
12 integrity (EJAC:  $P = 0.996$ , EPID:  $P = 0.700$ ) were observed for both sperm collection methods  
13 (Table 2).

14

#### 15 **4 Discussion**

16 This study is the first report on proAKAP4 concentrations in feline ejaculated and  
17 epididymal sperm after cryopreservation. According to our knowledge, there is only one study  
18 that evaluated proAKAP4 concentration in feline sperm, however, this study was primarily  
19 focused on testing three different lysis buffers to validating the test in the species (Prochowska  
20 et al., 2024). Moreover, the commercial proAKAP4 ELISA kit employed in our study is the  
21 latest version available following these assessments, featuring processing instructions distinct  
22 from those utilized in the prior study.

23 The comparative analysis of kinetics, sperm morphology and plasma membrane  
24 integrity between sperm collection methods, indicated that there was difference for VAP ( $P$   
25  $< 0.001$ ); VSL ( $P < 0.001$ ); VCL ( $P < 0.001$ ); ALH ( $P < 0.008$ ); Dance ( $P < 0.001$ ); SMI ( $P < 0.001$ );

1 SVI ( $P < 0.001$ ); Medium cells ( $P < 0.001$ ) and Static cells ( $P = 0.036$ ) and the other parameters  
2 evaluated were similar, regardless of the sperm collection method. Our findings contrast with  
3 those of Prochowska et al. (2016) which also compared sperm samples obtained by urethral  
4 catheterization and recovered of epididymal tail. However, their study reported that there was  
5 no difference in any sperm parameter post- cryopreservation regardless of sperm collection  
6 method. In their study, males were anesthetized with medetomidine and sperm collection was  
7 performed after 10 minutes. Additionally, the protocol for recovering epididymal tail  
8 spermatozoa differed, as did the composition of the extender, which consisted of TRIS-yolk  
9 and 6% glycerol. The samples were refrigerated for 1 hour at  $5^{\circ}\text{C}$ , and the straws were frozen  
10 in nitrogen vapor approximately 5cm from the liquid nitrogen column for a duration of 10  
11 minutes. Therefore, this discrepancy observed between studies can be attributed to variations  
12 in sperm collection protocols, as well as differences in extender composition and  
13 cryopreservation protocols employed.

14 In addition to conventional analysis, the next aspect analysed- proAKAP4  
15 concentration- showed a discrepancy between sperm collection methods. In frozen-thawed  
16 ejaculated spermatozoa, the proAKAP4 concentration range was  $30.43 \pm 3.45$  ng/mL (15.26-  
17 59.18 ng/mL), while in frozen-thawed epididymal spermatozoa the proAKAP4 concentration  
18 range was  $20.51 \pm 1.87$  ng/mL (12.15-35.36 ng/mL). In recent study by Prochowska et al.  
19 (2024), with ejaculated Tomcats sperm, they reported that fresh ejaculated sperm isolated using  
20 lysis buffer 1 (LB1; N=32) exhibited a proAKAP4 concentration range of 3.27 to 33.02 ng/mL  
21 (median: 9.12 ng/mL), whereas samples isolated with lysis buffer 3 (LB3; N=20) showed a  
22 proAKAP4 concentration range of 22.66 to 212.08 ng/mL (median: 123.96 ng/mL). Post-  
23 cryopreservation (N=15), there were alterations in proAKAP4 concentration (from median 8.34  
24 to 3.27 ng/mL,  $p < 0.05$ ) when samples were isolated with LB1. However, the modifications in

1 the manufacturer's instructions between the previous and current version available on the  
2 market, hinders direct comparison of findings between studies.

3         The lower expression of proAKAP4 found in this study in epididymal spermatozoa may  
4 be attributed to the lack of contact between epididymal spermatozoa and seminal plasma.  
5 Seminal plasma contains several proteins that directly or indirectly influence the prevention of  
6 the sperm membrane against damage caused by oxidative stress (Moura et al., 2007).  
7 Additionally, several proteins present in seminal plasma are associated with sperm motility  
8 (Baas et al., 1983), such as kallikrein-kinins, recognized as an important stimulator of post-  
9 ejaculation sperm motility (Schill et al., 1989). Another component of seminal plasma related  
10 to the kalikrein system is the angiotensin-converting enzyme (ACE) (Hohlbrugger et al., 1984),  
11 which catalyzes the formation of angiotensin II and binds to receptors on spermatozoa, resulting  
12 in increased motility (Vinson et al. al., 1996). Therefore, these findings reinforce that the higher  
13 expression of proAKAP4 occurs only in live and motile sperm (Delehedde et al., 2019; Sergeant  
14 et al., 2019).

15         The absence of a relationship between the proAKAPP4 concentration and  
16 morphological parameters was similar to previous a report on men (Jumeau et al., 2018) and  
17 Nelore bulls (Almeida et al., 2022).

18         In our study, we observed a relationship of proAKAP4 concentration on kinetic  
19 parameters such as, TM and Dance (VCLx ALH) in ejaculated sperm, while in epididymal  
20 sperm, there was a relationship of proAKAP4 concentration on TM and Static cells. The Dance  
21 value is the relation of the VCL x ALH parameters, which are used to determine hyperactivated  
22 motility (Hidalgo et al., 2022) and sperm hyperactivity is a stage in the capacitation process  
23 (Baker, 2006). Therefore, we can highlight the biomarker action of proAKAP4 in feline sperm,  
24 since in addition to its structural function, AKAP4 acts in the process of sperm capacitation, as  
25 it is related to sperm motility (Bloomaert et al., 2018).

1           The growing recognition of proAKAP4 as a biomarker for semen quality may be  
2 attributed to the availability of user-friendly commercial ELISA kits and research  
3 demonstrating a positive correlation between proAKAP4 concentration and sperm motility  
4 parameters in many species. Just like our findings, which indicated correlations with motility  
5 parameters, in equine sperm, was described a positive correlation between proAKAP4  
6 expression and total and progressive motility (Blommaert et al., 2018). Similarly, in sheep  
7 sperm, Riesco et al. (2020) identified positive associations with TM, PM, and a negative  
8 correlation with sperm apoptosis rate. Concerning bovine sperm, Almeida et al. (2022)  
9 indicated that proAKAP4 concentration were positively correlated with TM, PM, and fast cells,  
10 In addition, the concentration of proAKAP4 was a parameter that influenced the conception  
11 rate. Another study, in Prim'Holstein bulls, supported these findings, showing the correlation of  
12 proAKAP4 with sperm kinetics and establishing a relationship between proAKAP4  
13 concentration and rates of non-return to estrus (considering 90 days) (Dordas-Perpinyà et al.,  
14 2022). However, Bastan & Akcay (2021) found positive correlations between proAKAP4  
15 concentration and TM, PM and VSL and VCL parameters only after 3 hours of sperm incubation  
16 at 37°C. Taken together, these results reaffirm the proAKAP4 concentration as a reliable  
17 biomarker of sperm motility. However, although positive correlations were found in the studies  
18 described above, in prior study in felines, the proAKAP4 concentration did not show a  
19 correlation with any of the motility parameters evaluated, contrary to this, only some negative  
20 correlations were observed for cryopreserved samples in relation to VAP and VSL parameters.  
21 (Prochowska et al., 2024).

22           Our study is the first investigation using the latest available version of the commercial  
23 kit; therefore, additional research is necessary to add more results that reinforce the applicability  
24 of proAKAP4 as a motility biomarker.

25

## 1 Conclusion

2 In conclusion, our study revealed a relationship of proAKAP4 concentrations and  
3 kinetic parameters in ejaculated and epididymal spermatozoa post-cryopreservation. Therefore,  
4 we concluded that the proAKAP4 is a suitable biomarker to predict feline sperm motility.

## 6 Author Contributions

7 **Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo:** Resources, Data Curation, Project  
8 administration, Investigation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing; **Ana**  
9 **Beatriz Marques de Almeida:** Project administration; **Leticia Amanda dos Santos Silva:**  
10 **Methodology;** **Natália Ribeiro Sambatti:** Methodology; **Luiz Guilherme Corsi Trautwein:**  
11 **Methodology;** **João Carlos Pinheiro Ferreira:** Methodology; **Maria Isabel Mello Martins:**  
12 **Project administration, Investigation, Supervision, Writing - Review & Editing.**

## 13 References

- 14 Almeida, A. B. M., Hidalgo, M. M. T., de Moraes, F. L. Z., Trautwein, L. G. C., de Fátima  
15 Schnitzer, J., Silva, L. A. dos S., Rizzoto, G., Ferreira, J. C. P., & Martins, M. I. M.  
16 (2022). The proAKAP4 concentrations in Nelore bull sperm and their relation to FTAI  
17 conception rate results. *Animal Reproduction Science*, 247(September).  
18 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107156>
- 19 Bastan, I., & Akcay, E. (2021). Quality assessment of frozen bull semen with the precursor A-  
20 kinase anchor protein 4 biomarker. *Andrologia*, 53(9), 1–8.  
21 <https://doi.org/10.1111/and.14164>
- 22 Blommaert, D., Sergeant, N., Delehedde, M., Donnay, I., Lejeune, J. P., Franck, T., &  
23 Serteyn, D. (2021). First results about ProAKAP4 concentration in stallion semen after  
24 cryopreservation in two different freezing media. *Cryobiology*, 102(April), 133–135.  
25 <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.07.009>
- 26 Blommaert, D., Sergeant, N., Delehedde, M., Franck, T., Lejeune, J. P., & Serteyn, D. (2018).  
27 Significant Correlation Between the proAKAP4 Concentration and the Total and  
28 Progressive Motility in Stallion Sperm After Thawing. *Journal of Equine Veterinary*  
29 *Science*, 66, 43. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.05.019>
- 30 Blommaert, D., Sergeant, N., Delehedde, M., Jouy, N., Mitchell, V., Franck, T., Donnay, I.,  
31 Lejeune, J. P., & Serteyn, D. (2019). Expression, localization, and concentration of A-  
32 kinase anchor protein 4 (AKAP4) and its precursor (proAKAP4) in equine semen:  
33 Promising marker correlated to the total and progressive motility in thawed spermatozoa.  
34 *Theriogenology*, 131, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.011>

- 1 Brusentsev, E., Kizilova, E., Mokrousova, V., Kozhevnikova, V., Rozhkova, I., &  
2 Amstislavsky, S. (2018). Characteristics and fertility of domestic cat epididymal  
3 spermatozoa cryopreserved with two different freezing media. *Theriogenology*, *110*,  
4 148–152. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.12.038>
- 5 Buranaamnuay, K. (2017). Protocols for sperm cryopreservation in the domestic cat: A  
6 review. *Animal Reproduction Science*, *183*(November 2016), 56–65.  
7 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.06.002>
- 8 Carr, D. W., & Newell, A. E. H. (2007). The role of A-kinase anchoring proteins (AKaps) in  
9 regulating sperm function. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, *63*, 135–  
10 141.
- 11 Carracedo, S., Briand-Amirat, L., Dordas-Perpinyà, M., Ramos Escuredo, Y., Delcombel, R.,  
12 Sergeant, N., & Delehedde, M. (2022). ProAKAP4 protein marker: Towards a functional  
13 approach to male fertility. *Animal Reproduction Science*, *247*(June).  
14 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107074>
- 15 Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). (2013). *Manual para exame andrológico*  
16 *e avaliação de sêmen animal*. (3rd ed.).
- 17 Delehedde, M., Bloomaert, D., Jouy, N., Scabello, J., Miersman, H., Franck, T., Serteyn, D.,  
18 Mitchell, V., & Sergeant, N. (2018). Concentration of proAKAP4 as a pertinent read-out  
19 of sperm quality in mammals. *Animal Reproduction Science*, *194*, e24.  
20 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.04.053>
- 21 Delehedde, M., Carracedo, S., Selleslagh, M., Eddarkaoui, S., Amirat-Briand, L., & Sergeant,  
22 N. (2019). ProAKAP4 polypeptide as a biomarker of sperm functionality and male  
23 fertility disorders Abbreviations: AKAP4: A-kinase anchor protein 4; PKA: protein  
24 kinase A. *International Journal of Gynecology and Reproductive Sciences Int J Gynecol*  
25 *and Reprod Sci*, *2*(1), 13–19. [www.ologypress.com/submit-article](http://www.ologypress.com/submit-article)
- 26 Delehedde, M., Demouveaux, B., G, R., Selleslagh, M., Dewulf, Q., Desseyn, J.-L., Moreau,  
27 P., Gosset, P., Pichavant, M., & Sergeant, N. (2019). ProAKAP4 concentrations as an  
28 indicator of good spermatogenesis and sperm quality under oxidative stress conditions.  
29 *Andrology*, *7*(1), 85.
- 30 Dordas-Perpinyà, M., Sergeant, N., Ruelle, I., Bruyas, Jean-François Charreaux, F., Michaud,  
31 S., Carracedo, S., Catalán, J., Miró, J., Delehedde, M., & Briand-Amirat, L. (2022).  
32 ProAKAP4 Semen Concentrations as a Valuable Marker Protein of Post-Thawed Semen  
33 Quality and Bull Fertility: A Retrospective Study. *Veterinary Sciences*, *9*, 224.
- 34 Dordas-Perpinyà, M., Yanez-Ortiz, I., Sergeant, N., Mevel, V., Bruyas, J. F., Catalán, J.,  
35 Delehedde, M., Briand-Amirat, L., & Miró, J. (2022). ProAKAP4 Concentration Is  
36 Related to Sperm Motility and Motile Sperm Subpopulations in Frozen–Thawed Horse  
37 Semen. *Animals*, *12*(23), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ani12233417>
- 38 European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). (1998). Andrology  
39 Special Interest Group. In *Guidelines on the application of CASA technology in the*  
40 *analysis of spermatozoa* (pp. 142–145).
- 41 Fang, X., Huang, L. L., Xu, J., Ma, C. Q., Chen, Z. H., Zhang, Z., Liao, C. H., Zheng, S. X.,  
42 Huang, P., Xu, W. M., Li, N., & Sun, L. (2019). Proteomics and single-cell RNA  
43 analysis of Akap4-knockout mice model confirm indispensable role of Akap4 in  
44 spermatogenesis. *Developmental Biology*, *454*(2), 118–127.

- 1 <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.06.017>
- 2 Gabaldi, S. H., & Wolf, A (2002). A importância da termorregulação testicular na qualidade  
3 do sêmen de touros. *Ciências Agrárias e da Saúde*, 2 (3), 66–70.
- 4 Gardela, J., Ruiz-Conca, M., Palomares, A., Olvera-Maneu, S., García-Calvo, L., López-  
5 Béjar, M., Martínez-Pastor, F., & Álvarez-Rodríguez, M. (2023). Effect of Honey,  
6 Coenzyme Q10, and  $\beta$ -Carotene/ $\alpha$ -Tocopherol as Novel Additives in Rabbit-Sperm  
7 Cryopreservation Extender. *Animals*, 13(14), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ani13142392>
- 8 Hermansson, U., & Axner, E. (2007). Epididymal and ejaculated cat spermatozoa are resistant  
9 to cold shock but egg yolk promotes sperm longevity during cold storage at 4 °C.  
10 *Theriogenology*, 67(7), 1239–1248. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.01.008>
- 11 Hidalgo, M. M. T., de Almeida, A. B. M., Silva, L. A. S., Greggi, J. R., Silva, V. W.,  
12 Sambatti, N. R., Trautwein, L. G. C., & Martins, M. I. M. (2023). Comparison of two  
13 pharmacological semen collection times with  $\alpha$ 2-adrenergic agonist in domestic cats.  
14 *Reproduction in Domestic Animals*, June, 1–7. <https://doi.org/10.1111/rda.14420>
- 15 Jumeau, F., Sigala, J., Dossou-Gbete, F., Frimat, K., Barbotin, A. L., Buée, L., Béhal, H.,  
16 Sergeant, N., & Mitchell, V. (2018). A-kinase anchor protein 4 precursor (pro-AKAP4)  
17 in human spermatozoa. *Andrology*, 6(6), 854–859. <https://doi.org/10.1111/andr.12524>
- 18 Kastelic, J. P., Cook, R. B., & Coulter, G. H (1997). Contribution of the scrotum, testes, and  
19 testicular artery to scrotal/testicular thermoregulation in bulls at two ambient  
20 temperatures. *Animal Reproduction Science*, 45 (4), 255–261.  
21 <https://doi.org/10.3390/ani13142392>
- 22 Kowalczyk, A., Gałęska, E., & Bubel, A. (2022). The Concentration of ProAKAP4 and Other  
23 Indicators of Cryopotential of Spermatozoa Cryopreserved in Extender with  
24 Holothuroidea Extract Addition. *Animals*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/ani12040521>
- 25 Kumar, N., & Singh, N. K. (2021a). An Insight into Novel Sperm Cell Proteins as Bio-  
26 markers for Male Infertility: A Review. *Current Molecular Medicine*, 21(10), 850–859.  
27 <https://doi.org/10.2174/1566524021666210121142612>
- 28 Kumar, N., & Singh, N. K. (2021b). An Insight into Novel Sperm Cell Proteins as Bio-  
29 markers for Male Infertility: A Review. *Current Molecular Medicine*, 21(10), 850–859.  
30 <https://doi.org/10.2174/1566524021666210121142612>
- 31 Le Couazer, D., Delehedde, M., Ruelle, I., Sergeant, N., Michaud, S., Briand, L., &  
32 Bencharif, D. (2019). ProAKAP4 as a valuable marker to assess sperm quality in Dogs.  
33 *22nd Congress of the European-Veterinary-Society-for-Small-Animal-Reproduction*  
34 *(EVSSAR)*, 91–92.
- 35 Luconi, M., Cantini, G., Baldi, E., & Forti, G. (2011). Role of a-kinase anchoring proteins  
36 (AKAPs) in reproduction. *Frontiers in Bioscience Landmark*, 16(4), 1315–1330.  
37 <https://doi.org/https://doi.org/10.2741/3791>
- 38 Malo, C., Carracedo, S., Delehedde, M., Sergeant, N., & Skidmore, J. A. (2021).  
39 Identification of proAKAP4 concentration variations in dromedary sperm and their  
40 correlation with monthly semen parameters. *Reproduction and Fertility*, 2(4), 268–279.  
41 <https://doi.org/10.1530/RAF-21-0055>
- 42 Miki, K., Willis, W. D., Brown, P. R., Goulding, E. H., Fulcher, K. D., & Eddy, E. M. (2002).  
43 Targeted disruption of the Akap4 gene causes defects in sperm flagellum and motility.

- 1        *Developmental Biology*, 248(2), 331–342. <https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0728>
- 2        Moura, A. A (2007). A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid  
3        from mature Holstein bulls. *Animal Reproduction Science*, 98,169–188.
- 4        Núñez-Martínez, I., Moran, J. M., & Peña, F. J. (2006). A three-step statistical procedure to  
5        identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: Changes after  
6        cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(5), 408–415.  
7        <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00685.x>
- 8        Parkinson, T. J. (2004). Evaluation of fertility and infertility in natural service bulls.  
9        *Veterinary Journal*, 168(3), 215–229. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2003.10.017>
- 10       Prochowska, S., Eberhardt, M., & Nizański, W. (2024). Evaluation of a commercial  
11       proAKAP4 kit for the assessment of fresh and frozen–thawed feline spermatozoa.  
12       *Reproduction in Domestic Animals*, 59(3). <https://doi.org/10.1111/rda.14547>
- 13       Pukazhenthii, B., Neubauer, K., Jewgenow, K., Howard, J., & Wildt, D. (2006). The impact  
14       and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives.  
15       *Theriogenology*, 66(1), 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.03.020>
- 16       Pukazhenthii, B., Pelican, K., Wildt, D., & Howard, J. (1999). Sensitivity of Domestic Cat  
17       (*Felis catus*) Sperm from Normospermic versus Teratospermic Donors to Cold-Induced  
18       Acrosomal Damage1. *Biology of Reproduction*, 61(1), 135–141.  
19       <https://doi.org/10.1095/biolreprod61.1.135>
- 20       Pukazhenthii, B., Wildt, D. E., & Howard, J. G. (2001). The phenomenon and significance of  
21       teratospermia in felids. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 57, 423–433.
- 22       Riesco, M. F., Anel-Lopez, L., Neila-Montero, M., Palacin-Martinez, C., Montes-Garrido, R.,  
23       Alvarez, M., de Paz, P., & Anel, L. (2020). Proakap4 as novel molecular marker of  
24       sperm quality in ram: An integrative study in fresh, cooled and cryopreserved sperm.  
25       *Biomolecules*, 10(7), 1–21. <https://doi.org/10.3390/biom10071046>
- 26       Schill, W. B. (1989). Significance of the Kallikrein-kinin system in andrology. In: Fritz, H.,  
27       Schimidt, I., Dietze, G. *The Kallikrein-kinin system in health and disease*. Braunschweig,  
28       171-203.
- 29       Sergeant, N., Briand-Amirat, L., Bencharif, D., & Delehedde, M. (2019). The Sperm Specific  
30       Protein Proakap4 as an Innovative Marker to Evaluate Sperm Quality and Fertility.  
31       *Journal of Dairy & Veterinary Sciences*, 11(1).  
32       <https://doi.org/10.19080/jdvs.2019.11.555803>
- 33       Sergeant, N., Didier, B., Carracedo, S., Thierry, F., Lejeune, J.-P., Gevaert, M. H., Aubry, S.,  
34       Maurage, C.-A., Didier, S., & Delehedde, M. (2020). Assessment of the proAKAP4  
35       concentrations as a pertinent sperm parameter to select extenders and preservatives of  
36       stallion semen. *Animal Reproduction Science*, 220(106449), 89.  
37       <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106449>
- 38       Souza, W. L., & Morais, E. A. (2016). Atividade antioxidante da melatonina sobre o estresse  
39       oxidativo em espermatozoides: revisão de literatura. *Nutritime Revista Eletrônica*, 13(5),  
40       4831–4839. [http://nutritime.com.br/arquivos\\_internos/artigos/Artigo\\_396.pdf](http://nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/Artigo_396.pdf)
- 41       Schnitzer, J. F., Hidalgo, M. M. T., Almeida, A. B. M., Silva, L. A. S., Greggi, J. R., Silva,  
42       N. R., Silva, V. W., Trautwein, L. G. C., Bracarense, A. P. F. R. L., Martins, M. I. M  
43       (2022). Reacción inflamatoria inmediata causada por la administración intratesticular de

1           cloruro de calcio al 20 % asociado con DMSO 0,5 % en gatos. *Revista Brasileira de*  
2           *Reprodução Animal*, 46(4), 471.

3           Vijayaraghavan, S., Liberty, G. A., Mohan, J., Winfrey, V. P., Olson, G. E., & Carr, D. W.  
4           (1999). Isolation and molecular characterization of AKAP110, a novel, sperm-specific  
5           protein kinase A-anchoring protein. *Molecular Endocrinology*, 13(5), 705–717.  
6           <https://doi.org/10.1210/mend.13.5.0278>

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

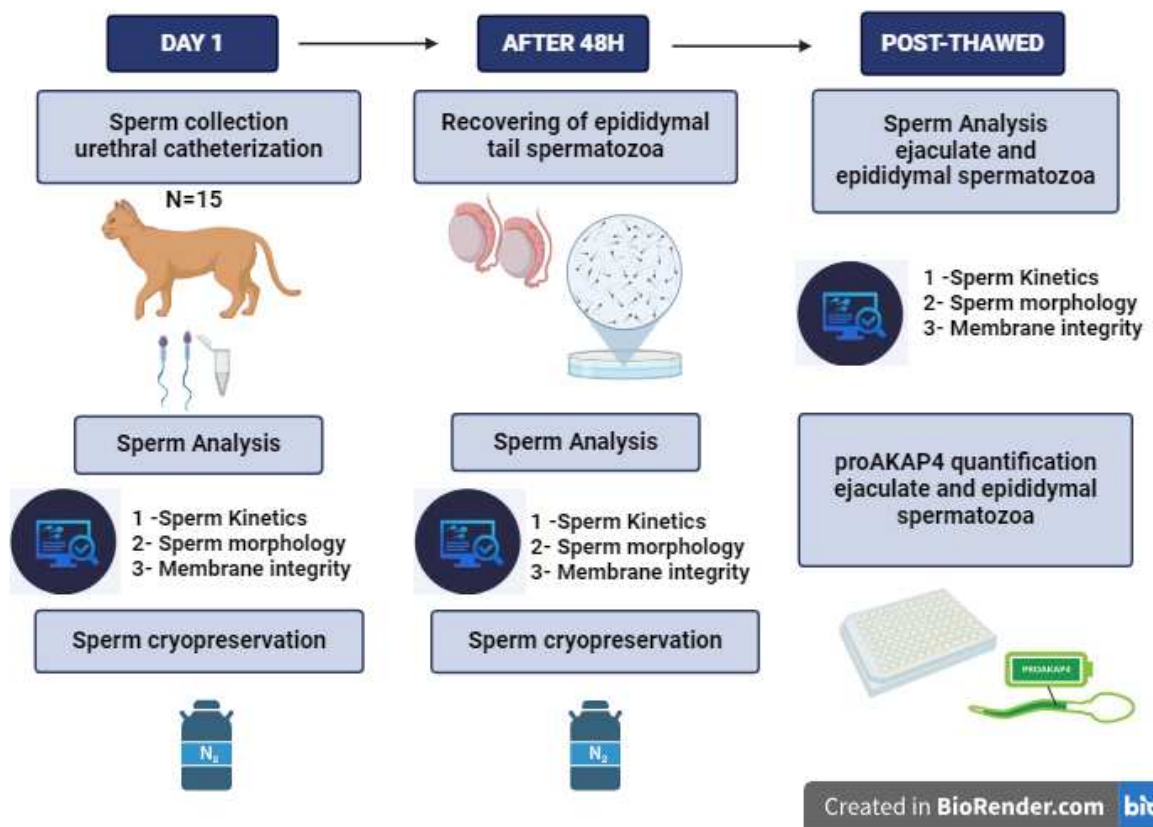
17

18

19

20

21



1  
2 **Figure 1** Overview of experimental design. Day 1: sperm collection, sperm analysis and  
3 cryopreservation. After 48h: recovering of epididymal tail spermatozoa, sperm analysis and  
4 cryopreservation. Post-thawed: sperm analysis of both sperm collection methods and proAKAP4  
5 quantification.

6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18

1

2 **Table 1** Sperm concentration, sperm morphology, plasma membrane integrity and Sperm kinetic  
 3 parameters of feline semen, evaluated using the CASA system, in ejaculate samples and collected by  
 4 urethral catheterization samples (mean  $\pm$  standard error)

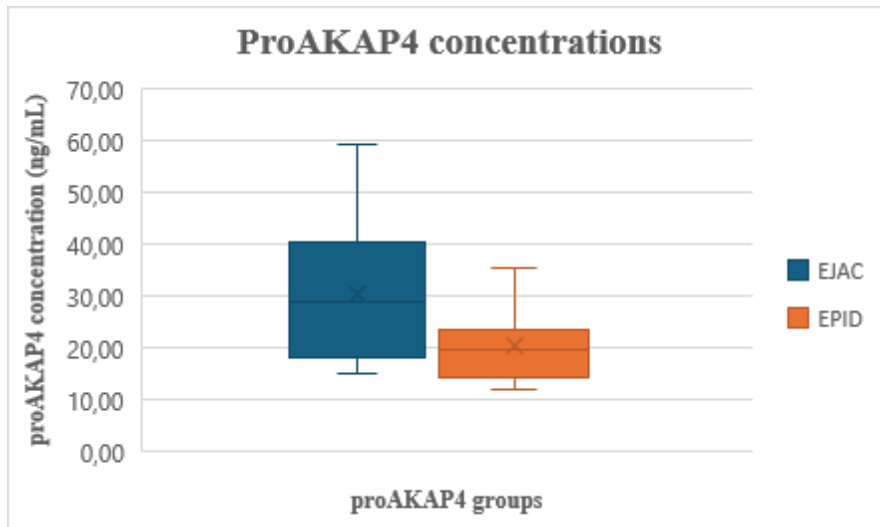
Parameters	Group		
	Ejaculate	Epididymis	P
[ ] $\times 10^6$ / mL	16.94 $\pm$ 2.87	11.35 $\pm$ 1.60	0.150
Major defects (%)	26.73 $\pm$ 2.42	29.40 $\pm$ 2.93	0.563
Minor defects (%)	5.13 $\pm$ 1.20	3.93 $\pm$ 0.80	0.475
Total defects (%)	31.80 $\pm$ 2.68	33.33 $\pm$ 3.02	0.756
Membrane integrity (%)	90.60 $\pm$ 1.06	90.73 $\pm$ 0.94	0.929
TM (%)	35.06 $\pm$ 4,0	27.13 $\pm$ 3.71	0.114
PM (%)	9.93 $\pm$ 1.01	10.53 $\pm$ 1.44	0.727
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	84.41 $\pm$ 2.04	110.92 $\pm$ 4.16	<b>&lt;0.001</b>
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	74.36 $\pm$ 1.67	98.92 $\pm$ 3.94	<b>&lt;0.001</b>
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	127.25 $\pm$ 3.13	159.49 $\pm$ 4.27	<b>&lt;0.001</b>
ALH ( $\mu\text{m}$ )	4.00 $\pm$ 0.15	4.92 $\pm$ 0.35	<b>0.008</b>
BCF (Hz)	42.60 $\pm$ 0.76	42.49 $\pm$ 1.73	0.956
STR (%)	88.20 $\pm$ 0.62	88.60 $\pm$ 1.16	0.796
LIN (%)	66.47 $\pm$ 1.08	69.65 $\pm$ 2.06	0.136
WOBBLE (%)	59.13 $\pm$ 0.98	63.00 $\pm$ 2.15	0.128
DANCE ( $\mu\text{m}^2$ )	512.35 $\pm$ 26.63	782.90 $\pm$ 55.80	<b>&lt;0.001</b>
SMI	264.95 $\pm$ 2.80	295.92 $\pm$ 7.04	<b>&lt;0.001</b>
SVI	246.88 $\pm$ 5.42	318.30 $\pm$ 9.38	<b>&lt;0.001</b>
RAPID (%)	11.67 $\pm$ 1.24	11.40 $\pm$ 1.92	0.906
MEDIUM (%)	4.73 $\pm$ 0.78	1.06 $\pm$ 0.20	<b>&lt;0.001</b>
SLOW (%)	28.93 $\pm$ 5.85	17.33 $\pm$ 5.52	0.112
STATIC (%)	54.73 $\pm$ 5.79	70.20 $\pm$ 5.95	<b>0.036</b>

5 *Note:* WOBBLE: wobble coefficient ( $[\text{VAP}/\text{VCL}] \times 100$ ); DANCE ( $\text{VCL} \times \text{ALH}$ ); SMI =  $(\text{VSL} \times 0.59) + (\text{VAP}$   
 6  $\times 0.37) + (\text{LIN} \times 0.95) + (\text{STR} \times 0.89) + (\text{WOB} \times 0.83)$  and SVI =  $(\text{VCL} \times 0.87) + (\text{VSL} \times 0.76) + (\text{VAP} \times 0.90)$   
 7  $+ (\text{ALH} \times 0.92)$ .

8 Abbreviations: ALH, lateral head amplitude; BCF, beat cross frequency; LIN, linearity; PM, progressive  
 9 motility; RAPID, fast sperm velocity, MEDIUM, medium sperm velocity; SLOW, slow sperm velocity; STATIC,

1 static sperm; STR, straightness; TM, total motility; VAP, average path velocity; VCL, curvilinear velocity; VSL,  
 2 straight line velocity.

3

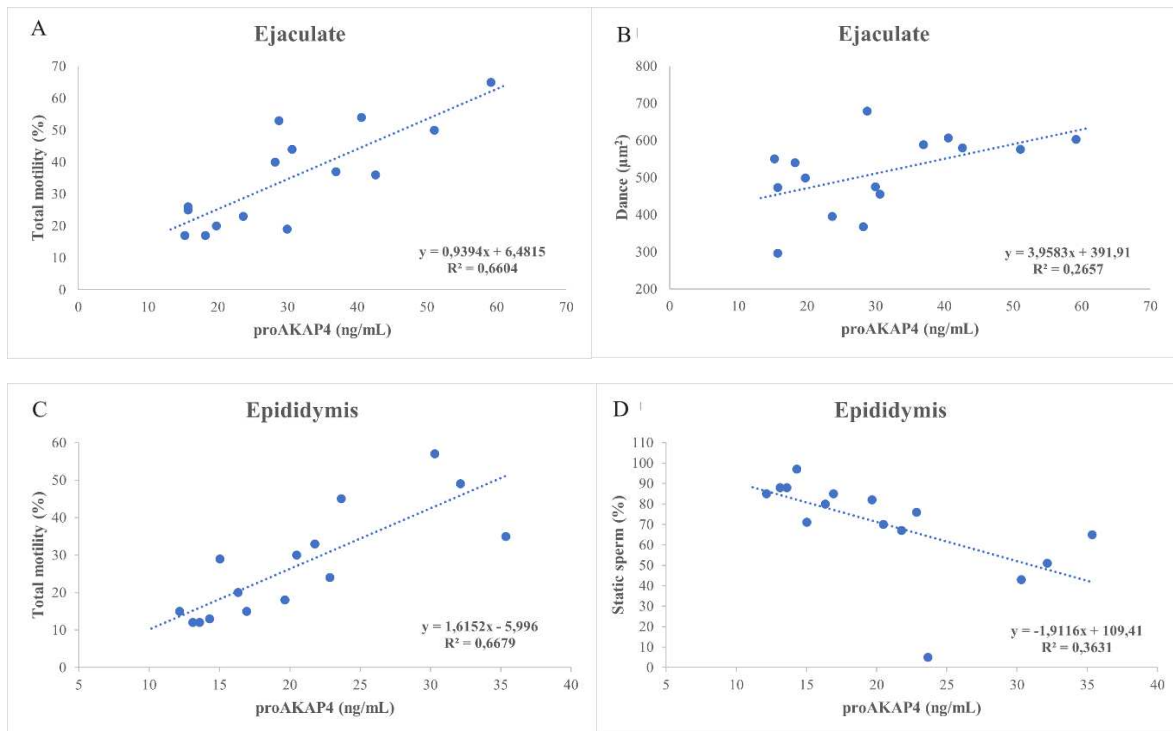


4

5 **Figure 2** ProAKAP4 concentration in ejaculate and epididymis group after cryopreservation (N=15).  
 6 The Upper and lower sides of the box represent lower and Upper quartilhes, the vertical line represntes  
 7 the median and the cross represents the mean. The whiskers represent minimum and maximum values.

8

9



10

11

12 **Figure 3** Graphical representation of the regression coefficient and equation between the proAKAP4  
 13 concentrations and total motility (A) and dance (B) in the ejaculated group and total motility (C) and  
 14 static sperm (D) in the epididymis group.

15

1 **Table 2** Linear Regression analysis results (r square and P value), considering the sperm concentration,  
 2 sperm morphological, membrane integrity and kinetics parameters as the dependent variable. and  
 3 proAKAP4 as the independent variable

Parameters	Group			
	Ejaculate		Epididymis	
	r <sup>2</sup>	P	r <sup>2</sup>	P
[ ] x10 <sup>6</sup> /mL	0.00168	0.885	0.0120	0.698
Major defects (%)	0.0443	0.451	0.0868	0.286
Minor defects (%)	0.0447	0.449	0.0143	0.671
Total defects (%)	0.0766	0.318	0.0645	0.361
Membrane Integrity (%)	0.00000175	0.996	0.0118	0.700
TM (%)	0.660	<b>&lt;0.001</b>	0.668	<b>&lt;0.001</b>
PM (%)	0.0823	0.300	0.0186	0.628
VAP (μm/s)	0.0270	0.558	0.134	0.179
VSL (μm/s)	0.00979	0.726	0.202	0.093
VCL (μm/s)	0.107	0.235	0.236	0.066
ALH (μm)	0.231	0.070	0.00252	0.859
BCF (Hz)	0.0188	0.627	0.231	0.069
STR (%)	0.0366	0.495	0.192	0.102
LIN (%)	0.0765	0.318	0.0235	0.586
WOBBLE (%)	0.0710	0.377	0.000540	0.935
DANCE (μm <sup>2</sup> )	0.266	<b>0.049</b>	0.0204	0.612
SMI	0.0186	0.628	0.118	0.210
SVI	0.0656	0.357	0.231	0.069
RAPID (%)	0.129	0.188	0.0898	0.278
MEDIUM (%)	0.0312	0.529	0.0746	0.325
SLOW (%)	0.157	0.144	0.0334	0.515
STATIC (%)	0.248	0.059	0.363	<b>0.017</b>

4 *Note:* WOBBLE ([VAP/VCL] × 100); DANCE (VCL × ALH); SMI = (VSL × 0.59) + (VAP × 0.37) + (LIN × 0.95) +  
 5 (STR × 0.89) + (WOB × 0.83) and SVI = (VCL × 0.87) + (VSL × 0.76) + (VAP × 0.90) + (ALH × 0.92).

6 Abbreviations: ALH, lateral head amplitude; BCF, beat cross frequency; LIN, linearity; PM, progressive motility; RAPID,  
 7 fast sperm velocity, MEDIUM, medium sperm velocity; SLOW, slow sperm velocity; STATIC, static sperm; STR,  
 8 straightness; TM, total motility; VAP, average path velocity; VCL, curvilinear velocity; VSL, straight line velocity.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

## CAPÍTULO II

### **INFLUÊNCIA DA CRIOPRESERVAÇÃO NO PERFIL DE METILAÇÃO DO DNA EM ESPERMATOZOIDES DE TILÁPIA DO NILO (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)**

## 1 1 INTRODUÇÃO

2 De acordo com o relatório da Organização das Nações Unidas, a  
3 população mundial vem crescendo de forma exponencial, atualmente estimada em  
4 oito bilhões de pessoas. Diante dessa realidade, a produção e distribuição de  
5 alimentos emerge como um dos principais desafios para enfrentar os alarmantes  
6 índices de fome. Essa situação se torna ainda mais preocupante diante de projeções  
7 futuras que indicam que a população poderá atingir 8,5 bilhões de pessoas até 2030  
8 e 9,7 bilhões até 2050 (UN, 2022).

9 Em 2021, a cientista de nutrição Shakuntala Haraksingh Thilsted foi  
10 laureada com o Prêmio Mundial da Alimentação, destacando a importância de  
11 priorizar os peixes nas políticas e ações de nutrição, tanto em nível nacional quanto  
12 global. Os alimentos provenientes do meio aquático geralmente são mais acessíveis  
13 e abundantes em comparação com outras fontes de proteína. Além disso, eles  
14 constituem fontes ricas em micronutrientes essenciais para a saúde humana e o  
15 desenvolvimento cognitivo, desempenhando um papel fundamental na redução da  
16 fome e da desnutrição (INTERNACIONAL SCIENCE COUNCIL, 2021).

17 O principal objetivo para aumentar a escala e reduzir os custos na  
18 produção de alimentos é a tecnificação dos processos de produção. Na cadeia  
19 produtiva de proteína animal, destacam-se os avanços principalmente na nutrição e  
20 melhoramento genético desses animais, e a tilápia do Nilo emergiu como uma espécie  
21 com grande potencial nesse processo. (BARRÍA *et al.*, 2023; PORTO *et al.*, 2015).

22 A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie pertencente à  
23 família dos ciclídeos, originária do continente africano, e atualmente é cultivada em  
24 diversos países, tornando-se um dos peixes mais produzidos na aquicultura mundial  
25 (PEIXE BR, 2024). Esse potencial produtivo se deve principalmente à sua  
26 adaptabilidade a diferentes condições ambientais, como variações de temperatura e  
27 salinidade (DE AZEVEDO *et al.*, 2015), sua precocidade e capacidade reprodutiva em  
28 diversos períodos do ano (ISHIKAWA; SHIMOSE; TACHIHARA, 2013), eficiente  
29 conversão alimentar (BARRÍA *et al.*, 2021), e ao fato de ser uma proteína amplamente  
30 aceita pelos consumidores (TAYLOR *et al.*, 2012).

31 Devido a esses atributos, a tilápia do Nilo tem sido empregada em  
32 programas de melhoramento genético, visando o desenvolvimento de linhagens mais  
33 precoces, com eficiente conversão alimentar, bom crescimento corporal e resistência

1 a patógenos (BARRÍA *et al.*, 2021; HU *et al.*, 2020), atendendo assim à crescente  
2 demanda do mercado consumidor. Nesse sentido, a aplicação de biotecnologias  
3 reprodutivas é fundamental para expressar esse melhoramento genético e preservar  
4 esse material (DE SIQUEIRA-SILVA *et al.*, 2018).

5 A criopreservação do sêmen de peixes é uma técnica que permite a  
6 conservação de material genético e o transporte de espermatozoides em longas  
7 distâncias possibilitando a disseminação deste potencial genético. Pesquisas vêm  
8 sendo realizadas a respeito da criopreservação de sêmen de peixes (ASTURIANO;  
9 CABRITA; HORVÁTH, 2017; GALO *et al.*, 2011; MURGAS *et al.*, 2007; VIVEIROS *et*  
10 *al.*, 2012). Entretanto, durante esse processo, ocorrem alterações físico-químicas  
11 significativas, como o estresse térmico e a modificação do estado físico da água,  
12 resultando na formação de cristais de gelo que podem causar danos à membrana e  
13 às organelas celulares. Adicionalmente, o estresse osmótico decorrente da oxidação  
14 celular resulta em espécies reativas de oxigênio (EROs), alterando a osmolaridade e  
15 induzindo danos no material genético, peroxidação das membranas lipídicas e  
16 apoptose (HEZAVEHEI *et al.*, 2018), diminuindo a viabilidade e capacidade de  
17 fertilização (WATSON, 2000).

18 Diversos estudos demonstraram que a capacidade competente dos  
19 espermatozoides tem um impacto significativo no sucesso da fertilização e na  
20 qualidade da prole, e fatores como a criopreservação podem afetar o padrão de  
21 metilação do DNA do espermatozoide (GASPARINI; DOSSELLI; EVANS, 2017;  
22 ZAJITSCHEK *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2023).

23 Portanto, para que a criopreservação de sêmen de peixes se torne  
24 uma prática eficiente e rotineira dentro do setor produtivo, há necessidade de  
25 investigar alterações na metilação do DNA em espermatozoides, antes que as  
26 consequências na progênie possam ser consideradas.

## 1 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2 2.1 TILÁPIA DO NILO

3 A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie de água doce  
4 pertencente à família dos ciclídeos. Originária da bacia do rio Nilo, no Leste da África,  
5 ela se encontra amplamente disseminada em regiões tropicais e subtropicais,  
6 abrangendo locais como Israel, Sudeste Asiático (Indonésia, Filipinas e Formosa) e  
7 Continente Americano (EUA, México, Panamá e toda a América do Sul) (DIAS, 2019;  
8 PADIAL *et al.*, 2017). Cerca de 70 espécies de tilápias já foram identificadas, com a  
9 maioria originária da África. No entanto, apenas quatro espécies do gênero  
10 *Oreochromis* alcançaram destaque na piscicultura mundial: a tilápia do Nilo  
11 (*Oreochromis niloticus*), a tilápia de Moçambique (*Oreochromis mossambicus*), a  
12 tilápia azul ou tilápia áurea (*Oreochromis aureus*) e a tilápia de Zanzibar (*Oreochromis*  
13 *urolepis hornorum*) (SILVA *et al.*, 2015).

14 Devido à sua adaptação ao *habitat* natural em climas tropicais, a  
15 tilápia do Nilo se desenvolve em temperaturas ideais que variam entre 28 a 30°C. Essa  
16 espécie possui uma notável capacidade de adaptação, sendo capaz de suportar  
17 variações mais amplas, com a temperatura letal mínima de 10°C e máxima de 37 a  
18 38°C. Quando exposta a variações menores, como por exemplo 20° e 30°C, a tilápia  
19 do Nilo é capaz de se desenvolver a 20°C, embora seu desempenho seja inferior em  
20 comparação à temperatura de 30°C (NEHEMIA; MAGANIRA, 2012). Ao analisar a  
21 influência da temperatura em juvenis, foi identificado um melhor desempenho na faixa  
22 de 26 a 30°C em comparação com as temperaturas de 22 e 34°C (AZAZA; DHRAÏEF;  
23 KRAÏEM, 2008).

24 Em relação à qualidade da água, vários fatores são considerados,  
25 como o pH, sendo ideal mantê-lo entre 6 e 8,5. A alcalinidade e a dureza são medidas  
26 em carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>), com valores diferentes: a alcalinidade em torno de  
27 40 mg/L e a dureza entre 40 e 60 mg/L. A salinidade deve estar entre 12 e 18g/L,  
28 sendo este último valor o limite suportável, porém, para reprodução, até 15g/L é  
29 considerado uma excelente faixa. Quanto ao oxigênio dissolvido, valores entre 4 e 5  
30 mg/L são suportáveis, enquanto o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) deve estar em torno de  
31 6 mg/L (SILVA *et al.*, 2015). Mesmo quando enfrentam desafios ambientais, essa

1 espécie mantém um bom desempenho na conversão alimentar e alcança a maturação  
2 precoce, atingindo o peso ideal para abate em um curto período de tempo, 4 meses  
3 (ISHIKAWA; SHIMOSE; TACHIHARA, 2013).

4 A tilápia do Nilo, apresenta características zootécnicas de grande  
5 interesse para a aquicultura, tais como: forma do corpo arredondada, reduzido  
6 tamanho da cabeça, rendimento de carcaça superior e melhor desempenho  
7 zootécnico, quando comparada a outras linhagens de tilápia (FURUYA, 2011). Esta  
8 espécie apresenta hábitos alimentares onívoros, demonstrando uma boa capacidade  
9 de digerir alimentos de origem tanto animal quanto vegetal. Como peixe filtrador  
10 extremamente eficiente, ela utiliza o alimento natural como base de sua dieta.  
11 Portanto, possui uma extrema plasticidade alimentar (BWANIKA *et al.*, 2006; VITULE;  
12 FREIRE; SIMBERLOFF, 2009). Adaptável a diferentes ambientes e sistemas de  
13 produção, é resistente a doenças, suportando densidades de estocagem elevadas e  
14 baixos teores de oxigênio dissolvido. Sua carne é saborosa, com baixo teor de gordura  
15 (0,9 g.100g<sup>-1</sup> de carne) e calorias (117 kcal.100g<sup>-1</sup> de carne), apresentando alto  
16 rendimento de filé (35 a 40%) e ausência de espinhos em forma de “Y” (mioceptos), o  
17 que a torna adequada para industrialização e confere elevado valor comercial,  
18 especialmente nos países desenvolvidos (CYRINO; CONTE, 2006; ZIMMERMANN;  
19 FITZSIMMONS, 2004).

20 O primeiro registro da introdução da tilápia do Nilo no Brasil ocorreu  
21 em 1971. Um pequeno número de exemplares foi trazido de Bouaké (Costa do Marfim,  
22 África) para Pentecostes, no Ceará, pelo Departamento Nacional de Obras Contra as  
23 Secas (DNOCS). No entanto, essa tentativa inicial não foi bem-sucedida devido a uma  
24 redução drástica na variabilidade genética, resultando em um desempenho inferior e  
25 um aumento na ocorrência de anomalias genéticas. A segunda importação conhecida  
26 ocorreu em 1996, no estado do Paraná, com a chegada de 20.800 alevinos da  
27 Tailândia (Ásia) (SILVA *et al.*, 2015).

28 As linhagens resultantes de programas de melhoramento genéticos  
29 disponíveis no mercado incluem a Tailandesa, conhecida como Chitralada ou  
30 Supreme tilápia Aquabel (GST), produzida por uma empresa norueguesa  
31 (GENOMAR) e introduzida no Brasil pela piscicultura Aquabel, em Rolândia, no  
32 Paraná. A GIFT (*Genetic Improvement of Farmed Tilapias*), originária da Malásia e  
33 inicialmente desenvolvida pelo ICLARM (*International Center for Living Aquatic*  
34 *Resources Management*), atual *WorldFish Center* e também a *Genetically Male Tilapia*

1 (GMT). Na GIFT e na GMT, há linhagens que possuem em sua genética YY,  
2 considerados Super Machos, apresentando duas cores distintas: prateadas (África) e  
3 vermelhas (Linhagens Puras, TUZINE *et al.*, 2022). Estas linhagens são importantes  
4 para melhorar a qualidade genética da tilápia e são essenciais para garantir o futuro  
5 da criação da espécie (LI *et al.*, 2006).

## 6 2.2 PRODUÇÃO

7 De acordo com a Associação Brasileira de Piscicultura (PEIXE BR.,  
8 2024) a produção mundial de tilápia do Nilo se mantém em alta, o crescimento atingiu  
9 3% em 2023 em relação a 2022, alcançando uma produção de 6,65 a 6,7 milhões de  
10 toneladas. Dentre os grandes produtores mundiais, a China mantém-se na liderança  
11 com níveis de produção chegando a 2,05 milhões/t/ano, seguido pela Indonésia (1,45  
12 mi/t/ano), Egito (1,10 mi/t/ano) e Brasil ocupando a 4° posição com níveis de produção  
13 atingindo 0,57 mi/t/ano, com possibilidade de atingir 600 mil toneladas nesse ano de  
14 2024.

15 As exportações da piscicultura brasileira aumentaram 4% em valor  
16 (US\$ 24,7 milhões) em 2023. Neste cenário a tilápia e seus produtos representaram  
17 94% da exportação brasileira com crescimento de 1% em relação a 2022.  
18 Considerando a exportação de tilápia por estado; o Paraná manteve a posição de  
19 maior exportador brasileiro de tilápia em 2023, com US\$ 18,6 milhões, representando  
20 80% do total. Na segunda posição, está São Paulo, com US\$ 2,7 milhões (12% do  
21 total), seguido pela Bahia, com US\$ 1,3 milhões (6% do total) (PEIXE BR, 24).

22 O Paraná ocupa a primeira posição dos 10 maiores Estados  
23 produtores de peixes de cultivo, atingindo uma produção de 213.300 toneladas com  
24 produção maciça de tilápias (209,500 toneladas). A produção de peixes de cultivo  
25 cresceu 9,9% em relação a 2023, o que representa 24% da produção nacional,  
26 seguido pelos estados de São Paulo (82,400 mil toneladas) e Minas Gerais (61,600  
27 mil toneladas). Além disso, um terço da produção nacional está representada pela  
28 região Sul (296,200 toneladas), participando com 33,4% da produção nacional (PEIXE  
29 BR, 2024).

## 1 2.3 ASPECTOS REPRODUTIVOS E BIOTECNOLOGIAS APLICADAS À REPRODUÇÃO

2 A tilápia do Nilo é uma espécie ovulípara, o que significa que realiza  
3 a fecundação externamente. Além disso, é considerada prolífica, o que implica que a  
4 reprodução desses peixes é influenciada pela idade e tamanho. A maturação gonadal  
5 ocorre precocemente, entre o 3° e o 4° mês, quando atingem um peso de 30 a 40  
6 gramas. As fêmeas apresentam um tipo de reprodução parcelada, ou seja, se  
7 reproduzem várias vezes ao ano, geralmente de 8 a 12 desovas, que ocorrem a cada  
8 5 a 7 semanas. No entanto, a desova só acontece quando a temperatura da água está  
9 acima de 24°C (SILVA *et al.*, 2015).

10 Os machos constroem ninhos circulares e são responsáveis pela  
11 defesa do território, expulsando outros peixes. Eles preferem ambientes propícios  
12 para o acasalamento, como leitos, taludes, fundos lamacentos ou arenosos, ou  
13 mesmo pisos de viveiros e reservatórios com lâminas de água de 0,30 a 1,50m de  
14 profundidade. Os ninhos podem ter até 30cm de diâmetro e profundidade variável. Em  
15 ambientes naturais, os ninhos preferidos pelos machos estão em regiões rasas dos  
16 corpos d'água, com diâmetro entre 10 e 15 cm. Já em tanques, os machos constroem,  
17 com suas bocas, depressões côncavas de 20 a 90cm de diâmetro. Após a construção  
18 dos ninhos, os machos atraem as fêmeas por feromônios, executam a corte e ocorre  
19 o acasalamento. As fêmeas depositam os ovos dentro do ninho, onde são fertilizados  
20 pelos machos. (SILVA *et al.*, 2015; TUZINE *et al.*, 2022).

21 Após a fertilização, os ovos são capturados pela fêmea e incubados  
22 na região da boca por cerca de 3 a 5 dias. Após a eclosão, as larvas permanecem na  
23 boca da mãe por 5 a 7 dias, saindo apenas quando absorvem todo o saco vitelínico,  
24 o que geralmente ocorre em 10 a 15 dias. As fêmeas cuidam da prole por  
25 aproximadamente 4 semanas antes de se reproduzirem novamente, mantendo um  
26 ciclo de 8 a 12 desovas anuais (GONÇALVES-DE-FREITAS *et al.*, 2019; SILVA *et al.*,  
27 2015).

28 As características reprodutivas favoráveis para programas de  
29 melhoramento genético, como alta fertilidade, maturidade sexual precoce e desova  
30 frequente (parcelada), trazem consigo desafios significativos para os piscicultores  
31 durante o processo de engorda. Essas características podem resultar em  
32 superpopulação, prolongamento do período de engorda e aumento da variabilidade  
33 de peso do lote durante a despesca (TURRA *et al.*, 2010). Ademais, a disputa por

1 território entre machos e fêmeas, as fêmeas não ganham peso devido o cuidado com  
2 os ovos e o desenvolvimento e competição das larvas no tanque, contribuem para  
3 esses desafios. Tudo isso acarreta maiores gastos com alimentação, que é o principal  
4 custo variável da produção (BARDHAN *et al.*, 2021).

5 Neste sentido, as biotecnologias reprodutivas emergiram como  
6 alternativa para prevenir as desovas de tilápias. Uma prática amplamente adotada é  
7 a criação de populações monossexo de machos, pois estes tendem a apresentar  
8 melhor desempenho zootécnico do que as fêmeas. A população de machos pode ser  
9 obtida por meio de métodos como sexagem manual, hibridização, inversão sexual ou  
10 utilização de reprodutores supermacho (YY). Exceto pela sexagem manual, todas  
11 essas técnicas são consideradas como manipulações sexuais (TURRA *et al.*, 2010).

12 Ademais, biotecnologias como a criopreservação de espermatozoides  
13 e ovos permitiriam, desde o início dos programas de melhoramento genético, a criação  
14 de reservas de material em criobancos para o controle interno dos programas, bem  
15 como a disseminação desse potencial genético em longas distâncias (DE SIQUEIRA-  
16 SILVA *et al.*, 2018).

#### 17 2.4 MÉTODOS DE COLHEITA E ANÁLISE DE SÊMEN

18 Em peixes de água doce, como a tilápia do Nilo, os espermatozoides  
19 estão quiescentes no trato reprodutivo masculino devido à osmolaridade e aos íons  
20 K<sup>+</sup> do plasma seminal. Geralmente, a motilidade espermática é ativada em meio com  
21 osmolaridade inferior à do plasma seminal (300 mOsmol Kg<sup>-1</sup>). Devido a esses fatores,  
22 precauções devem ser tomadas para evitar a contaminação da amostra com muco,  
23 urina, fezes ou sangue, pois isso também pode resultar em uma ativação precoce da  
24 amostra, reduzindo a viabilidade dos espermatozoides (MARIA; CARNEIRO, 2012;  
25 WANKANAPOL, 2020).

26 Para colheita de sêmen de peixes, a metodologia mais empregada é  
27 a massagem abdominal. Contudo, é fundamental que o animal esteja anestesiado  
28 para evitar estresse, mortalidade e possíveis contaminantes na amostra (ALMEIDA *et*  
29 *al.*, 2016; WANKANAPOL, 2020). Destacam-se como agentes anestésicos a  
30 quinaldina e os óleos essenciais, como cravo, eucalipto e menta (REZENDE *et al.*,  
31 2017). Entre eles, o óleo de cravo é amplamente utilizado, agindo como um anestésico  
32 de imersão que induz a tilápia do Nilo a um estado de inconsciência reversível,

1 facilitando a manipulação e a colheita com menores efeitos colaterais (SHOKR;  
2 FATHY, 2018).

3 O peixe anestesiado ou sedado é retirado da água e imobilizado. Para  
4 auxiliar na contenção, é possível cobrir sua cabeça com uma toalha úmida. Após  
5 contenção, o orifício urogenital deve ser seco com papel toalha para evitar a  
6 contaminação e ativação espermática. A massagem abdominal nos machos deve ser  
7 realizada de forma suave, sem causar traumas físicos no animal, no sentido da cabeça  
8 para a cauda, direcionando o conteúdo do saco espermático no sentido da cauda. A  
9 quantidade de sêmen (volume e número de espermatozoides por mL) produzida varia  
10 de acordo com a espécie, desempenho individual, tamanho do peixe e método de  
11 colheita.

12 O sêmen pode ser recuperado em um recipiente de boca larga para  
13 evitar a perda de material. Para garantir que todo o material em contato com a amostra  
14 colhida esteja seco e sem contaminação, pode-se recolher o ejaculado em 2 ou 3  
15 recipientes. Caso ocorra contaminação, a alíquota deverá ser descartada (IWASHITA  
16 *et al.*, 2015). Após colheita do ejaculado, o recipiente com o material colhido deve ser  
17 acondicionado em caixa térmica resfriada, evitando o contato direto do sêmen com  
18 gelo. O armazenamento em gelo permite a redução do metabolismo energético e  
19 melhora a qualidade espermática quando ativada para análise (WANKANAPOL,  
20 2020). Em seguida, o peixe deve ser devolvido com cuidado à caixa de aclimação,  
21 e é importante observá-lo durante o seu retorno à consciência. Todo o procedimento  
22 deve ser realizado rapidamente (5~10 min) para evitar que o animal sofra estresse  
23 devido à exposição ao ar (IWASHITA *et al.*, 2015). Variações da técnica de massagem  
24 abdominal podem ser utilizadas como a massagem com deposição direta em tubo tipo  
25 *ependorff*, a cateterização da papila urogenital e por seringa sem agulha também  
26 acoplada na papila urogenital (BEIRÃO *et al.*, 2019).

27 Devido às particularidades de cada espécie, compreender as  
28 características seminais é essencial para avaliar a qualidade reprodutiva desses  
29 animais. Esse conhecimento viabiliza a otimização das biotécnicas reprodutivas como  
30 a criopreservação. Entender o perfil espermático de uma espécie oferece diversas  
31 vantagens, incluindo a melhor utilização dos gametas e a produção de um maior  
32 número de embriões viáveis. Além disso, é fundamental que essas avaliações sejam  
33 realizadas tanto a fresco quanto pós descongelamento para atestar o sucesso do  
34 protocolo. As características seminais podem variar dentro de um grupo de

1 reprodutores, ou mesmo para o mesmo animal, dependendo do período e da  
2 frequência de colheita ao longo da estação reprodutiva (ALMEIDA *et al.*, 2016;  
3 CABRITA *et al.*, 2011).

4 A análise da motilidade espermática é o teste mais utilizado para  
5 prever a qualidade espermática, visto que, ao entrarem em contato com a água os  
6 espermatozoides devem apresentar capacidade de ativar a motilidade, garantindo  
7 assim sua capacidade de alcançar os oócitos durante a fertilização e de manter essa  
8 motilidade por um período adequado. A motilidade espermática reflete as mudanças  
9 ocorridas nas estruturas celulares responsáveis pela ativação e sustentação do  
10 movimento progressivo, incluindo a integridade mitocondrial, a produção de ATP  
11 (adenosina trifosfato), a ativação dos canais de proteínas da membrana plasmática e  
12 a estrutura flagelar (BOBE; LABBÉ, 2010; MARTÍNEZ-PASTOR *et al.*, 2008).

13 A análise pode ser conduzida de forma subjetiva com uso de  
14 microscopia ótica (BOZKURT *et al.*, 2019), ou de forma objetiva com o uso de  
15 softwares como o sistema CASA (*Computer-assisted sperm analysis*) (SARMENTO  
16 *et al.*, 2017). As estimativas da taxa de motilidade são feitas observando-se a  
17 movimentação dos espermatozoides imediatamente após a adição de uma solução  
18 ativadora, já que o tempo de motilidade costuma ser breve (VIVEIROS; GODINHO,  
19 2009). Outro parâmetro comumente utilizado para avaliar a qualidade do sêmen *in*  
20 *vitro* é o vigor espermático, que deve ser avaliado em conjunto com a motilidade dos  
21 espermatozoides. O vigor refere-se à qualidade do movimento exibido pelos  
22 espermatozoides, levando em consideração tanto a velocidade quanto a progressão  
23 do movimento. Esse vigor é avaliado em uma escala de zero a cinco, em que o escore  
24 0 é atribuído aos espermatozoides que não apresentam movimento, e o escore 5 é  
25 dado aos espermatozoides que exibem movimento rápido e progressão aprimorada  
26 (GARNER; HAFEZ, 2004).

27 A determinação da concentração espermática desempenha um papel  
28 crucial nas técnicas de reprodução assistida em peixes, pois serve como parâmetro  
29 para determinar a quantidade de sêmen necessária para a fecundação, visando  
30 alcançar a dose inseminante ideal para cada espécie. Esse processo permite melhorar  
31 as taxas de fertilização e promover o uso eficiente do plantel de reprodutores  
32 (SANCHES *et al.*, 2011). Geralmente, a concentração espermática é avaliada pela  
33 contagem de espermatozoides em uma câmara de Neubauer, e pode variar de acordo  
34 com o peso ou idade do peixe, a época do período reprodutivo, a frequência de

1 colheita e o volume recuperado (BEIRÃO *et al.*, 2019; VIVEIROS; GODINHO, 2009).

2 A análise da morfologia espermática é frequentemente utilizada para  
3 identificar e quantificar deformidades ou anomalias nos espermatozoides. Essas  
4 alterações podem estar relacionadas com diversos fatores, como resultados da  
5 espermatogênese, doenças, restrição alimentar ou estresse ambiental. Algumas das  
6 deformidades observadas incluem flagelo dobrado, cabeça isolada, presença de gotas  
7 citoplasmáticas próximas e distais, bem como alterações decorrentes de  
8 procedimentos de manejo durante a colheita de sêmen, como flagelo quebrado,  
9 enrolado, degenerado, macrocefalia e microcefalia (DA COSTA *et al.*, 2019;  
10 SARMENTO *et al.*, 2017).

11 A integridade de membrana é um importante parâmetro da qualidade  
12 espermática, pois ela confere ao espermatozoide a funcionalidade adequada e  
13 necessária para a fertilização. Durante o processo de criopreservação, as células  
14 espermáticas sofrem crioinjúrias que podem promover a ruptura e lesões irreversíveis  
15 nas membranas celulares, resultando em queda na eficiência da reprodução. Deste  
16 modo, a análise de integridade de membrana consiste em um método que quantifica  
17 o percentual de células lesadas antes e após a congelação (BOZKURT; YAVAŞ, 2016;  
18 HEZAVEHEI *et al.*, 2018). Esta análise pode ser realizada empregando corantes  
19 convencionais, como eosina-negrosina, observados sob microscopia óptica  
20 (BOZKURT *et al.*, 2019), e também utilizando corantes fluorescentes, como iodeto de  
21 propídeo e SYBR *green*, avaliados tanto em microscopia de epifluorescência quanto  
22 em citometria de fluxo (ALMEIDA *et al.*, 2016).

23 Ensaios de fertilização de oócitos também podem ser utilizados como  
24 método que oferece resultados de grande importância do ponto de vista prático. No  
25 entanto, nem todos os estudos o realizam devido à variação na qualidade dos oócitos  
26 entre as fêmeas, o que pode resultar em taxas de fertilização variáveis. Além disso, é  
27 essencial determinar a dose inseminante mínima para cada espécie, a fim de obter  
28 resultados de fertilização mais confiáveis (SUQUET *et al.*, 2000). A taxa de fertilização  
29 alcançada com o uso do sêmen criopreservado é empregada para avaliar a qualidade  
30 do sêmen após a descongelação e a eficácia do protocolo de criopreservação  
31 (HORVÁTH *et al.*, 2008).

32

### 33 2.5 CRIOPRESERVAÇÃO

34 Um dos principais objetivos da criopreservação de sêmen é a

1 conservação dos recursos genéticos, pois em poucas gerações, características  
2 genéticas específicas podem ser perdidas em estoques naturais e cultivados  
3 (CARNEIRO *et al.*, 2012). Esse processo pode ser evitado por meio de ações prévias  
4 de colheita e preservação do sêmen, juntamente com a formação de bancos de  
5 germoplasma (MOREIRA *et al.*, 2001). As aplicações dos bancos de sêmen de peixes  
6 incluem: Redução do número de reprodutores (machos) mantidos na piscicultura;  
7 Diminuição de custos; Sincronização do ciclo reprodutivo; Desenvolvimento de  
8 programas de melhoramento genético, com a seleção de animais de alto desempenho  
9 (GODINHO, 2007). Por outro lado, o uso comercial de sêmen de peixes não é uma  
10 prática comum nos sistemas de produção, embora seja uma realidade em outras  
11 espécies, como salmão, *catfish*, linguado, entre outros. No entanto, essa prática tende  
12 a se tornar mais frequente na aquicultura brasileira assim que alguns desafios  
13 metodológicos forem superados (GODINHO, 2007).

14 A técnica de criopreservação consiste na aplicação da criobiologia  
15 para a manutenção de uma variedade de tipos celulares, reduzindo ou interrompendo  
16 seu metabolismo em baixas temperaturas. Um dos métodos empregados é a  
17 congelamento, que mantém as células a uma temperatura de menos 196°C por tempo  
18 indeterminado (SHARAFI *et al.*, 2022).

19 Durante esse processo, ocorrem alterações físico-químicas  
20 significativas, como o estresse térmico e a modificação do estado físico da água,  
21 resultando na formação de cristais de gelo que podem causar danos à membrana e  
22 às organelas celulares. Adicionalmente, o estresse osmótico decorrente da oxidação  
23 celular resulta em espécies reativas de oxigênio (EROs), alterando a osmolaridade e  
24 induzindo danos no material genético, peroxidação das membranas lipídicas e  
25 apoptose (HEZAVEHEI *et al.*, 2018), diminuindo a viabilidade e capacidade de  
26 fertilização (WATSON, 2000).

27 Para reduzir os danos causados na estrutura e na funcionalidade dos  
28 espermatozoides durante a criopreservação, é crucial avançar no desenvolvimento de  
29 meios de diluição que incluam compostos como crioprotetores, carboidratos, soluções  
30 tampão, ácidos graxos e antioxidantes (HEZAVEHEI *et al.*, 2018; SHARAFI *et al.*,  
31 2022).

32 Partindo do princípio de que o diluente interage com a célula  
33 espermática, é crucial manter a osmolaridade, o pH e a capacidade de tamponamento  
34 do meio para garantir o sucesso da criopreservação (RIESCO; ROBLES, 2013). Os

1 crioprotetores são adicionados ao meio diluente para proteger os espermatozoides  
2 durante a queda da temperatura na congelação, podendo ser classificados como  
3 intracelulares ou extracelulares.

4 Os crioprotetores intracelulares são moléculas de baixo peso  
5 molecular que conseguem atravessar a membrana plasmática, promovendo a  
6 desidratação do espermatozoide e aumentando a viscosidade do meio para estabilizar  
7 a membrana plasmática e evitar a formação de cristais de gelo intracelulares.  
8 Exemplos incluem álcoois como glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), metanol,  
9 etilenoglicol, e amidas como dimetilacetamida, dimetilformamida e metilformamida  
10 (ALVARENGA et al., 2005; WHALEY et al., 2021). No entanto, essas moléculas  
11 podem ser tóxicas para as células espermáticas, e sua adição deve ser controlada  
12 para não prejudicar a criopreservação (SHARAFI et al., 2022). Um estudo comparou  
13 as concentrações de três diferentes crioprotetores (glicerol, metanol e DMSO) em  
14 sêmen de Tilápia do Nilo e demonstrou que concentrações de 15% foram prejudiciais  
15 à qualidade espermática, enquanto a qualidade foi menor em concentrações de 5%  
16 em comparação com 10% (BOZKURT et al., 2019).

17 Os crioprotetores extracelulares, por sua vez, agem na membrana  
18 plasmática aumentando a viscosidade do meio extracelular para controlar a formação  
19 de cristais de gelo extracelulares. Exemplos incluem gema de ovo, lecitina, soluções  
20 iônicas e açúcares (HEZAVEHEI et al., 2018). No entanto, seu uso excessivo pode  
21 danificar o citoesqueleto (SHARAFI et al., 2022). A gema de ovo é frequentemente  
22 utilizada em mamíferos e há relatos de seu uso em tilápia do Nilo (YONG; NGUANG;  
23 KARI, 2018). Os açúcares, como trealose, glicose e rafinose, desempenham um papel  
24 importante não apenas no fornecimento de energia para os espermatozoides, mas  
25 também no controle da formação de cristais de gelo extracelulares, agindo como  
26 crioprotetores de membrana externa. A ação desses açúcares ocorre por osmose,  
27 facilitando a transferência de moléculas de água do meio intracelular para o  
28 extracelulares, resultando em efeitos positivos em diversas espécies (SHARAFI et al.,  
29 2022). A trealose, tem sido empregada na criopreservação de sêmen de peixes como  
30 o Tambaqui (*Colossoma macropomum*) (VARELA JUNIOR et al., 2022), enquanto a  
31 glicose tem sido utilizada na criopreservação de sêmen de tilápia Moçambicana, em  
32 associação com o metanol (*Oreochromis mossambicus*) (UGWU et al., 2019).

33 A formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) ocorre durante  
34 a peroxidação lipídica, liberando moléculas como peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),

1 ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e radical hidroxila (OH<sup>-</sup>) de forma natural. O controle dessa  
2 formação é realizado por enzimas como superóxido dismutase, catalase e glutathione  
3 redutase, e por moléculas como metionina, ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol  
4 (vitamina E) e taurina (AMIDI *et al.*, 2016).

5 Contudo, se a regulação das EROs durante a criopreservação for  
6 deficiente, podem ocorrer danos irreversíveis aos espermatozoides, incluindo  
7 rompimento da membrana plasmática e mitocondrial, fragmentação do DNA e perda  
8 de motilidade e capacidade fecundante (AMIDI *et al.*, 2016; HEZAVEHEI *et al.*, 2018;  
9 LI *et al.*, 2010). A inclusão de antioxidantes na criopreservação tem sido benéfica, mas  
10 deve ser controlada para evitar alterações no pH e intensificação das reações de  
11 peroxidação (SHARAFI *et al.*, 2022). A Taurina, um aminoácido sulfônico e  
12 antioxidante não enzimático, possui a capacidade de se ligar às Espécies Reativas de  
13 Oxigênio (EROs), eliminando-as.

14 Estudos realizados em diferentes espécies de peixes, como Dourada  
15 (*Sparus aurata*) e Robalo (*Dicentrarchus labrax*), demonstraram melhorias na  
16 motilidade e redução na fragmentação do DNA quando o antioxidante foi adicionado  
17 em concentrações de 1 e 10 mM (CABRITA *et al.*, 2011). Em carpas, concentrações  
18 de 25, 50, 75 e 100 mM de Taurina no diluente foram comparadas, sendo que a  
19 concentração de 75 mM apresentou os melhores resultados em termos de motilidade,  
20 viabilidade e capacidade de fertilização (YAVAŞ; BOZKURT; YILDIZ, 2014). Em tilápia  
21 do Nilo, um estudo avaliou os efeitos da adição de taurina no diluente em três  
22 concentrações (1, 5 e 50 mM), indicando que o acréscimo de 1 mM de taurina no meio  
23 de diluição iônico permitiu uma redução nas perdas cinéticas ocasionadas pela  
24 criopreservação de espermatozoides (SILVA *et al.*, 2023).

25 Na prática, o desenvolvimento de uma solução crioprotetora  
26 específica para uma determinada espécie de peixe requer ensaios para avaliar  
27 quaisquer efeitos tóxicos e sua influência na integridade e funcionalidade das células  
28 espermáticas. Tanto a seleção dessas substâncias quanto suas proporções na  
29 solução crioprotetora devem ser personalizadas para cada espécie de peixe, pois  
30 podem haver diferenças significativas entre elas (CARNEIRO *et al.*, 2012).

31 A proporção entre o meio diluente e o sêmen normalmente utilizada  
32 varia de 3:1 a 10:1, dependendo da concentração final necessária para a fertilização.  
33 Para o armazenamento, a forma mais adequada de manipular essas doses envolve o  
34 uso de palhetas plásticas, que, após a congelação, podem ser organizadas nos

1 botijões criogênicos. Para isso, identificações individuais são feitas nas palhetas, que  
2 são então colocadas em "goblets" ou "cassetes" plásticos, ou ainda em raques de  
3 alumínio, e armazenadas nas canecas em botijões criogênicos (BILLARD *et al.*, 2004;  
4 CAROLSFELD *et al.*, 2003). O sêmen geralmente é refrigerado a 5°C em geladeira e  
5 posteriormente congelado, com as palhetas posicionadas em rampas horizontais e  
6 expostas inicialmente ao vapor e depois imersas diretamente no nitrogênio líquido  
7 para armazenamento (CAROLSFELD *et al.*, 2003). Atualmente, a automatização do  
8 processo de refrigeração e congelação tem sido amplamente utilizada com sucesso  
9 em várias espécies, trazendo vantagens significativas na uniformização e controle de  
10 qualidade do sêmen congelado. Muitas etapas podem ser eliminadas ou simplificadas  
11 com o uso do "*dry shipper*" para algumas espécies, permitindo a introdução direta das  
12 palhetas nos botijões (CAROLSFELD *et al.*, 2003; DA COSTA *et al.*, 2019; TAITSON;  
13 CHAMI; GODINHO, 2008). Da mesma forma, é importante determinar a taxa de  
14 descongelação para o uso do sêmen após o armazenamento em nitrogênio líquido  
15 (BILLARD *et al.*, 2004).

16 O aprimoramento dos protocolos de criopreservação tem sido  
17 impulsionado pelo entendimento dos mecanismos de congelação e descongelação  
18 das células espermáticas. Diversos materiais utilizados para o envase de sêmen são  
19 utilizados nas biotecnologias da reprodução, incluindo palhetas de 0,25 ou 0,5 mL,  
20 macropalhetas, criotubos, sacos e tubos plásticos com capacidade de  
21 armazenamento variada, geralmente entre 1 e 5 mL. A maioria dos estudos sobre  
22 congelação de sêmen de peixes brasileiros tem empregado palhetas francesas de 0,5  
23 mL (CAROLSFELD *et al.*, 2003; MARIA *et al.*, 2006; VIVEIROS; GODINHO, 2009).

24 Contudo, diversas pesquisas utilizando crioprotetores menos  
25 agressivos ou combinações mais adequadas de meios diluentes, assim como  
26 diferentes tipos de recipientes de armazenamento, demonstram a possibilidade de  
27 modificar a morfologia dos cristais de gelo formados durante a congelação  
28 (CANCIMANSI; SILVA; VAN TILBURG, 2010). Isso sugere que, dependendo do  
29 tamanho e do diâmetro do material de envase, a descongelação pode não ser  
30 uniforme, com a superfície descongelando mais rapidamente do que a porção central  
31 (MARIA; CARNEIRO, 2012).

32 Ao nosso conhecimento, não existem estudos abordando a qualidade  
33 e eficácia do sêmen de tilápia do Nilo após criopreservação, considerando diferentes  
34 volumes e tamanhos de palhetas. Portanto, o desenvolvimento de novos protocolos

1 de armazenamento surge como uma alternativa para preservar as características  
2 espermáticas após a descongelação.

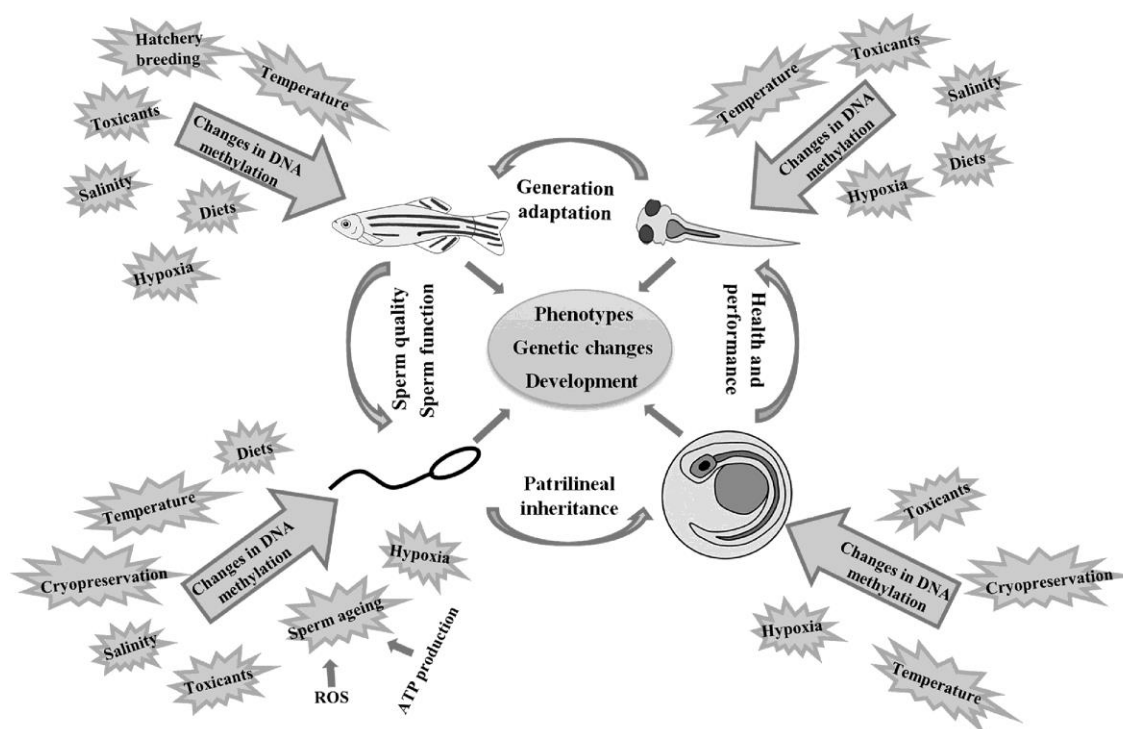
### 3 2.6 EPIGENÉTICA

4 Para manter e aprimorar a produção aquícola, é fundamental  
5 compreender os mecanismos genéticos e fisiológicos que regem as características  
6 desejadas. A elucidação desses mecanismos impulsionou o desenvolvimento de  
7 métodos biotecnológicos inovadores com aplicações importantes. Por exemplo, os  
8 marcadores moleculares são empregados na seleção de reprodutores, enquanto  
9 estudos transcriptômicos têm sido utilizados para aprimorar as condições ambientais  
10 e reduzir o estresse fisiológico em animais (GAVERY; ROBERTS, 2017). Neste  
11 contexto, o avanço no entendimento da importância da metilação do DNA para o  
12 desenvolvimento do organismo levantou preocupações sobre o impacto dos fatores  
13 ambientais nos gametas durante a gametogênese e a desova. Fatores ambientais,  
14 aparentemente não hereditários, e o estilo de vida de um indivíduo são refletidos no  
15 padrão de metilação do DNA do genoma do esperma, o que tem sido associado a  
16 mudanças fenotípicas nas gerações seguintes. Essa correlação evidente levanta  
17 questões sobre o impacto das técnicas de reprodução assistida (MI *et al.*, 2021;  
18 ROTONDO *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2023).

19 A Epigenética é derivada o prefixo grego epi, que significa “acima ou  
20 sobre algo”, combinada com a genética (WADDINGTON, 1942). Pode ser definida  
21 como alterações na expressão gênica que são herdadas durante a divisão celular e  
22 ao longo das gerações, mas que não modificam a sequência de bases nucleotídicas  
23 do DNA. E ainda, trata-se de marcações que controlam a atividade do genoma e  
24 podem ser transmitidas por mitose ou meiose, envolvendo não apenas a expressão  
25 gênica, mas também a regulação de elementos transponíveis e o controle da estrutura  
26 da cromatina (BOHACEK; MANSUY, 2017).

27 Na aquicultura, a fertilização, o desenvolvimento embrionário e o  
28 desempenho da progênie são medidas-chave no manejo dos reprodutores e são  
29 suscetíveis a serem influenciadas pelas condições ambientais durante a interação  
30 entre espermatozoides e oócitos, bem como durante o processo de fertilização  
31 (PINTO; DA SILVA CASTRO; VAL, 2021; ZHANG *et al.*, 2023). Diversos estudos  
32 demonstraram que a capacidade competente dos espermatozoides tem um impacto

1 significativo no sucesso da fertilização e na qualidade da prole. Essas pesquisas  
 2 indicam diversos fatores, tanto internos quanto externos, como poluentes ambientais,  
 3 dieta, criopreservação, temperatura, salinidade e estresse oxidativo, que podem afetar  
 4 o padrão de metilação do DNA do espermatozoide (GASPARINI; DOSSELLI; EVANS,  
 5 2017; ZAJITSCHKEK *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2023) (Figura 1).  
 6



7  
 8 Figura 1. Esquema representativo que mostra os efeitos de vários sinais ambientais na  
 9 metilação do DNA. Fonte: adaptado ZHANG *et al.*, 2023)

10

11 A metilação do DNA refere-se à adição enzimática de um grupo metil  
 12 a um resíduo de citosina no DNA, que ocorre quase exclusivamente em dinucleotídeos  
 13 CpG (isto é, uma citosina localizada a 5' de uma guanina) em animais. A maquinaria  
 14 enzimática que suporta a metilação do DNA compreende uma família de DNA  
 15 metiltransferases (DNMTs), que inclui a metiltransferase de manutenção DNMT1  
 16 (responsável por copiar padrões pré-existent de metilação do DNA para a nova fita  
 17 durante a mitose) e as metiltransferases *de novo* DNMT3A/3B. Sabe-se que a  
 18 metilação do DNA tem um efeito silenciador quando ocorre em promotores de genes,  
 19 seja por meio de associações com outras proteínas de ligação ao DNA ou pelo  
 20 bloqueio físico de fatores de transcrição (BELL; FELSENFELD, 2000).

21

A criopreservação de gametas oferece um método eficaz para a

1 reprodução em incubatórios, visando proteger biologicamente espécies ameaçadas e  
2 estabelecer um banco de recursos genéticos. No entanto, ainda é praticamente  
3 desconhecido se a criopreservação afeta a metilação do DNA dos espermatozoides  
4 (ZHANG *et al.*, 2023). Estudos mostraram efeitos complexos associados às diferentes  
5 espécies e crioprotetores utilizados. Em bagre amarelo (*Pelteobagrus fulvidraco*), os  
6 autores compararam os espermatozoides criopreservados com e sem crioprotetor e  
7 observaram regulação negativa do transcriptoma de espermatozoides  
8 criopreservados com Me<sub>2</sub>SO (YANG *et al.*, 2019).

9           A criopreservação também induziu uma hipometilação global dos  
10 espermatozoides do tambaqui (*Colossoma macropomum*), quaisquer que fossem os  
11 crioprotetores testados, incluindo MeOH, DMSO e glicerol (DE MELLO *et al.*, 2017).  
12 Da mesma forma, o metanol (MeOH) não alterou a metilação do DNA na enguia  
13 europeia e no peixe dourado, mas desencadeou uma ligeira hipermetilação no  
14 zebrafish. A metilação do DNA do peixe dourado não foi completamente insensível à  
15 criopreservação, uma vez que o dimetilsulfóxido (DMSO) e o 1,2-propanodiol  
16 induziram alguma hipometilação do DNA nesta espécie (DEPINCÉ *et al.*, 2020). Em  
17 truta arco-íris, a metilação do DNA foi ligeiramente alterada após a criopreservação  
18 do espermatozoide, independente do crioprotetor utilizado (glicerol, MeOH ou DMSO)  
19 (EL KAMOUH *et al.*, 2023). Alterações anormais de metilação detectadas no sêmen  
20 criopreservado podem resultar de crioprotetor(es) e envolvem processos de  
21 hipometilação e hipermetilação (KAWAI *et al.*, 2010). No geral, a criopreservação pode  
22 induzir um risco de alteração da metilação no DNA nos espermatozoides, mas a  
23 extensão dos danos ao genoma e das suas regiões funcionais ainda é pouco estudada  
24 (ZHANG *et al.*, 2023).

25           A tilápia do Nilo, é importante na Aquicultura e tem sido uma espécie  
26 presente em programas de melhoramento genético nas últimas décadas (BARRÍA *et*  
27 *al.*, 2021; DE SIQUEIRA-SILVA *et al.*, 2018). Portanto, investigar alterações na  
28 metilação do DNA ao nível dos espermatozoides é o primeiro passo a ser realizado  
29 antes que as consequências na progênie possam ser consideradas.

30  
31  
32  
33  
34

### 1 3 REFERÊNCIAS

- 2 ALMEIDA, D. B.; COSTA, M. A. P.; BASSINI, L. N.; CALABUIG, C. I. P.; MOREIRA,  
3 C. G.; RODRIGUES, M. D. N.; JUNIOR, A. S. V.; CORCINI, C. D.; DODE, M. E. B.;  
4 MOREIRA, H. L. M. Sperm evaluation in strains of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*.  
5 **Journal of Advances in Agriculture**, v. 6, n. 2, p. 933–941, 2016.
- 6 AMIDI, F.; PAZHOHAN, A.; SHABANI NASHTAEI, M.; KHODARAHMIAN, M.;  
7 NEKOONAM, S. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. **Cell and Tissue**  
8 **Banking**, v. 17, n. 4, p. 745–756, 2016.
- 9 ASTURIANO, J. F.; CABRITA, E.; HORVÁTH. Progress, challenges and perspectives  
10 on fish gamete cryopreservation: A mini-review. **General and Comparative**  
11 **Endocrinology**, v. 245, p. 69–76, 2017.
- 12 AZAZA, M. S.; DHRAÏEF, M. N.; KRAÏEM, M. M. Effects of water temperature on  
13 growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in  
14 geothermal waters in southern Tunisia. **Journal of Thermal Biology**, v. 33, n. 2, p.  
15 98–105, 2008.
- 16 BARDHAN, A.; SAU, S. K.; KHATUA, S.; BERA, M.; PAUL, B. N. A Review on the  
17 Production and Culture Techniques of Monosex Tilapia. **International Journal of**  
18 **Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 10, n. 01, p. 565–577, 2021.
- 19 BARRÍA, A.; BENZIE, J. A. H.; HOUSTON, R. D.; DE KONING, D. J.; DE VERDAL, H.  
20 Genomic Selection and Genome-wide Association Study for Feed-Efficiency Traits in  
21 a Farmed Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Population. **Frontiers in Genetics**, v.  
22 12, n. September, p. 1–13, 2021.
- 23 BARRÍA, A.; PEÑALOZA, C.; PAPADOPOULOU, A.; MAHMUDDIN, M.; DOESCHL-  
24 WILSON, A.; BENZIE, J. A. H.; HOUSTON, R. D.; WIENER, P. Genetic differentiation  
25 following recent domestication events: A study of farmed Nile tilapia (*Oreochromis*  
26 *niloticus*) populations. **Evolutionary Applications**, v. 16, n. 6, p. 1220–1235, 2023.
- 27 BEIRÃO, J.; BOULAIS, M.; GALLEGO, V.; O'BRIEN, J. K.; PEIXOTO, S.; ROBECK,  
28 T. R.; CABRITA, E. Sperm handling in aquatic animals for artificial reproduction.  
29 **Theriogenology**, v. 133, p. 161–178, 2019.
- 30 BELL, A. C.; FELSENFELD, G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls  
31 imprinted expression of the *Igf2* gene. **Nature**, v. 405, n. 6785, p. 482–485, 2000.  
32 Disponível em:  
33 <<http://www.nature.com/doi/10.1038/35013100>>  
34 <<http://www.nature.com/doi/10.1038/35013100>>.
- 35 BILLARD, R.; COSSON, J.; NOVEIRI, S. B.; POURKAZEMI, M. Cryopreservation and  
36 short-term storage of sturgeon sperm, a review. **Aquaculture**, v. 236, n. 1–4, p. 1–9,  
37 2004.
- 38 BOBE, J.; LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative**  
39 **Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 535–548, 2010. Disponível em:  
40 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.011>>.
- 41 BOHACEK, J.; MANSUY, I. M. A guide to designing germline-dependent epigenetic  
42 inheritance experiments in mammals. **Nature Methods**, v. 14, n. 3, p. 243–249, 2017.
- 43 BOZKURT, Y.; YAVAŞ, İ. Cryopreservation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

- 1 sperm. **Cryopreserv Eukaryotes**, 2016.
- 2 BOZKURT, Y.; YAVAŞ, İ.; BUCAK, M. N.; YENI, D. Effect of different cryoprotectants  
3 (Glycerol, methanol and dimethyl sulfoxide) on post-thaw quality, viability, fertilization  
4 ability and dna damage of cryopreserved Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)  
5 spermatozoa. **Cryo-Letters**, v. 40, n. 1, p. 11–17, 2019.
- 6 BWANIKA, G. N.; CHAPMAN, L. J.; KIZITO, Y.; BALIRWA, J. Cascading effects of  
7 introduced Nile perch (*Lates niloticus*) on the foraging ecology of Nile tilapia  
8 (*Oreochromis niloticus*). **Ecology of Freshwater Fish**, v. 15, n. 4, p. 470–481, 2006.
- 9 CABRITA, E.; MA, S.; DIOGO, P.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; SARASQUETE, C.;  
10 DINIS, M. T. The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm  
11 motility, viability and DNA fragmentation. **Animal Reproduction Science**, v. 125, n. 1,  
12 p. 189–195, 2011.
- 13 CANCEMANSI, J. A. N.; SILVA, J. F. S.; VAN TILBURG, M. F. Recipientes de  
14 armazenamento de sêmen congelado e seu efeito sobre a crio-sobrevivência  
15 espermática. **Pubvet**, v. 4, n. 42, p. 301–316, 2010.
- 16 CARNEIRO, P. C. F.; AZEVEDO, H. C.; SANCHES, E. G.; MARIA, A. N. **Manual de**  
17 **Curadores de Germoplasma – Animal: Conservação**. [s.l: s.n.].
- 18 CAROLSFELD, J.; GODINHO, H. P.; ZANIBONI FILHO, E.; HARVEY, B. J.  
19 Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish**  
20 **Biology**, v. 63, n. 2, p. 472–489, 2003.
- 21 CYRINO, J. E.; CONTE, L. Tilapicultura em Gaiolas: produção e economia. *In: In:*  
22 **José Eurico Possebon Cyrino e Elisabeth Criscuolo Urbinati. AquaCiência 2004:**  
23 **Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aquicultura**. [s.l: s.n.]p. 151–171.
- 24 DA COSTA, B. B.; MARQUES, L. S.; LASSEN, P. G.; RODRIGUES, R. B.; STREIT,  
25 D. P. Cryopreservation-induced morphological changes in the sperm of South  
26 American silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 35, n.  
27 4, p. 987–993, 2019.
- 28 DE AZEVEDO, R. V.; DOS SANTOS-COSTA, K.; DE OLIVEIRA, K. F.; FLORES-  
29 LOPES, F.; TEIXEIRA-LANNA, E. A.; TAVARES-BRAGA, L. G. Responses of Nile  
30 tilapia to different levels of water salinity. **Latin American Journal of Aquatic**  
31 **Research**, v. 43, n. 5, p. 828–835, 2015.
- 32 DE MELLO, F.; GARCIA, J. S.; GODOY, L. C.; DEPINCÉ, A.; LABBÉ, C.; STREIT, D.  
33 P. The effect of cryoprotectant agents on DNA methylation patterns and progeny  
34 development in the spermatozoa of *Colossoma macropomum*. **General and**  
35 **Comparative Endocrinology**, v. 245, p. 94–101, 2017. Disponível em:  
36 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.06.003>>.
- 37 DE SIQUEIRA-SILVA, D. H.; SAITO, T.; DOS SANTOS-SILVA, A. P.; DA SILVA  
38 COSTA, R.; PSENICKA, M.; YASUI, G. S. Biotechnology Applied to Fish  
39 Reproduction: Tools for Conservation. **Fish physiology and biochemistry**, v. 44, n.  
40 6, p. 1469–1485, dez. 2018.
- 41 DEPINCÉ, A.; GABORY, A.; DZIEWULSKA, K.; LE BAIL, P. Y.; JAMMES, H.; LABBÉ,  
42 C. DNA methylation stability in fish spermatozoa upon external constraint: Impact of  
43 fish hormonal stimulation and sperm cryopreservation. **Molecular Reproduction and**

- 1 **Development**, v. 87, n. 1, p. 124–134, 2020.
- 2 DIAS, M. T. A introdução da tilápia em ambientes diversos de sua origem e as  
3 consequências negativas. **Embrapa**, v. 003, p. 4, 2019. Disponível em:  
4 <[https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/197073/1/CPAF-AP-2019-NT-](https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/197073/1/CPAF-AP-2019-NT-003-Introducao-tilapias.pdf)  
5 003-Introducao-tilapias.pdf>.
- 6 EL KAMOUH, M.; BRIONNE, A.; SAYYARI, A.; LAURENT, A.; LABBÉ, C.  
7 Cryopreservation effect on DNA methylation profile in rainbow trout spermatozoa.  
8 **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 1–14, 2023.
- 9 FURUYA, W. M. Tabelas Brasileiras para a nutrição de tilápia. **Toledo: GFM**, p. 98,  
10 2011.
- 11 GALO, J. M.; STREIT-JUNIOR, D. P.; SIROL, R. N.; RIBEIRO, R. P.; DIGMAYER, M.;  
12 ANDRADE, V. X. L.; EBERT, A. R. Anormalidades espermáticas de piracanjuba  
13 *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) após a criopreservação. **Brazilian Journal**  
14 **of Biology**, v. 71, n. 3, p. 693–699, 2011.
- 15 GARNER, D. .; HAFEZ, E. S. E. Espermatozoides e plasma seminal. *In*: **Hafez, E. S.**  
16 **E e Hafez, B. Reprodução Animal**. [s.l.: s.n.]
- 17 GASPARINI, C.; DOSSELLI, R.; EVANS, J. P. Sperm storage by males causes  
18 changes in sperm phenotype and influences the reproductive fitness of males and their  
19 sons. **Evolution Letters**, v. 1, n. 1, p. 16–25, 2017.
- 20 GAVERY, M. R.; ROBERTS, S. B. Epigenetic considerations in aquaculture. **PeerJ**, v.  
21 2017, n. 12, 2017.
- 22 GODINHO, H. P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aqüicultura : bases  
23 para o. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 351–360, 2007.
- 24 GONÇALVES-DE-FREITAS, E.; BOLOGNESI, M. C.; GAUY, A. C. D. S.; BRANDÃO,  
25 M. L.; GIAQUINTO, P. C.; FERNANDES-CASTILHO, M. Social behavior and welfare  
26 in Nile Tilapia. **Fishes**, v. 4, n. 2, p. 1–14, 2019.
- 27 HEZAVEHEI, M.; SHARAFI, M.; KOUCHESFAHANI, H. M.; HENKEL, R.; AGARWAL,  
28 A.; ESMAEILI, V.; SHAHVERDI, A. Sperm cryopreservation: A review on current  
29 molecular cryobiology and advanced approaches. **Reproductive BioMedicine**  
30 **Online**, v. 37, n. 3, p. 327–339, 2018. Disponível em:  
31 <<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012>>.
- 32 HORVÁTH, Á.; WAYMAN, W. R.; DEAN, J. C.; URBÁNYI, B.; TIERSCH, T. R.; MIMS,  
33 S. D.; JOHNSON, D.; JENKINS, J. A. Viability and fertilizing capacity of cryopreserved  
34 sperm from three North American acipenseriform species: A retrospective study.  
35 **Journal of Applied Ichthyology**, v. 24, n. 4, p. 443–449, 2008.
- 36 HU, Q.; AO, Q.; TAN, Y.; GAN, X.; LUO, Y.; ZHU, J. Genome-Wide DNA Methylation  
37 and RNA Analysis Reveal Potential Mechanism of Resistance to Streptococcus  
38 Agalactiae in GIFT Strain of Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus* ). **Journal of**  
39 **immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 204, n. 12, p. 3182–3190, jun. 2020.
- 40 HUNGERFORD, A.; BAKOS, H. W.; AITKEN, R. J. Sperm cryopreservation: current  
41 status and future developments. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 35, n.  
42 3, p. 265–281, dez. 2022.

- 1 ISHIKAWA, T.; SHIMOSE, T.; TACHIYARA, K. Life history of an invasive and  
2 unexploited population of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and geographical  
3 variation across its native and non-native ranges. **Environmental Biology of Fishes**,  
4 v. 96, n. 5, p. 603–616, 2013.
- 5 IWASHITA, M. K. P.; ALVES, A. L.; MATAVELI, M.; VARELA, E. S.; KIRSCHNIK, L.  
6 N. G. **Manejo sanitário para criopreservação de sêmen de reprodutores de**  
7 **peixes nativos** Embrapa. [s.l: s.n.].
- 8 KAWAI, K.; LI, Y. S.; SONG, M. F.; KASAI, H. DNA methylation by dimethyl sulfoxide  
9 and methionine sulfoxide triggered by hydroxyl radical and implications for epigenetic  
10 modifications. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 1, p. 260–265,  
11 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.10.124>>.
- 12 LI, P.; LI, Z. H.; DZYUBA, B.; HULAK, M.; RODINA, M.; LINHART, O. Evaluating the  
13 impacts of osmotic and oxidative stress on common carp (*Cyprinus carpio*, L.) sperm  
14 caused by cryopreservation techniques. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 5, p. 852–  
15 858, 2010.
- 16 LI, S. F.; HE, X. J.; HU, G. C.; CAI, W. Q.; DENG, X. W.; ZHOU, P. Y. Improving growth  
17 performance and caudal fin stripe pattern in selected F6-F8 generations of GIFT Nile  
18 tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) using mass selection. **Aquaculture Research**, v. 37,  
19 n. 12, p. 1165–1171, 2006.
- 20 MARIA, A. N.; CARNEIRO, P. C. F. Criopreservação de sêmen de peixes no Brasil:  
21 Estado da arte e perspectivas futuras. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 124–131, 2012.  
22 Disponível em:  
23 <[http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/CONERA\\_PALESTRA\(9\).pdf](http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/CONERA_PALESTRA(9).pdf)>.
- 24 MARIA, A. N.; VIVEIROS, A. T. M.; FREITAS, R. T. F.; OLIVEIRA, A. V. Extenders  
25 and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)  
26 semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, v. 260, n. 1–4, p. 298–306,  
27 2006.
- 28 MARTÍNEZ-PASTOR, F.; CABRITA, E.; SOARES, F.; ANEL, L.; DINIS, M. T.  
29 Multivariate cluster analysis to study motility activation of *Solea senegalensis*  
30 spermatozoa: A model for marine teleosts. **Reproduction**, v. 135, n. 4, p. 449–459,  
31 2008.
- 32 MI, S.; CHEN, S.; LI, W.; FANG, L.; YU, Y. Effects of sperm DNA methylation on  
33 domesticated animal performance and perspectives on cross-species epigenetics in  
34 animal breeding. **Animal Frontiers**, v. 11, n. 6, p. 39–47, 2021.
- 35 MOREIRA, H. L. M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; ZIMMERMANN, S. **Fundamentos**  
36 **da Moderna Aquicultura**. [s.l: s.n.]
- 37 MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; FREITAS, R. T. F. de; PEREIRA, G. J. M.  
38 Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de  
39 diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.  
40 36, n. 3, p. 526–531, 2007.
- 41 NEHEMIA, A.; MAGANIRA, J. Length-Weight relationship and condition factor of tilapia  
42 species grown in marine and fresh water ponds. **Agriculture and Biology Journal of**  
43 **North America**, v. 3, n. 3, p. 117–124, 2012.

- 1 PADIAL, A. A.; AGOSTINHO, Â. A.; AZEVEDO-SANTOS, V. M.; FREHSE, F. A.;  
2 LIMA-JUNIOR, D. P.; MAGALHÃES, A. L. B.; MORMUL, R. P.; PELICICE, F. M.;  
3 BEZERRA, L. A. V.; ORSI, M. L.; PETRERE-JUNIOR, M.; VITULE, J. R. S. The  
4 “Tilapia Law” encouraging non-native fish threatens Amazonian River basins.  
5 **Biodiversity and Conservation**, v. 26, n. 1, p. 243–246, 2017.
- 6 PEIXE BR. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PISCICULTURA. **Anuário 2024- Peixe**  
7 **Brasil da Piscicultura. A força do peixe brasileiro**. [s.l: s.n.].
- 8 PINTO, G. L.; DA SILVA CASTRO, J.; VAL, A. L. Copper and cadmium impair sperm  
9 performance, fertilization and hatching of oocytes from Amazonian fish *Colossoma*  
10 *macropomum*. **Chemosphere**, v. 266, p. 128957, 2021. Disponível em:  
11 <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128957>>.
- 12 PORTO, E. de P.; OLIVEIRA, C. A. L. de; MARTINS, E. N.; RIBEIRO, R. P.; CONTI,  
13 A. C. M.; KUNITA, N. M.; OLIVEIRA, S. N. de; PORTO, P. P. Respostas à seleção de  
14 características de desempenho em tilápia do Nilo. **Pesquisa Agropecuária**  
15 **Brasileira**, v. 50, n. 9, p. 745–752, 2015.
- 16 REZENDE, F. P.; PASCOAL, L. M.; VIANNA, R. A.; TEIXEIRA LANNA, E. A. Sedação  
17 de tilápia do Nilo com óleos essenciais: Melaleuca, cravo, eucalipto e menta. **Revista**  
18 **Caatinga**, v. 30, n. 2, p. 479–486, 2017.
- 19 ROTONDO, J. C.; LANZILLOTTI, C.; MAZZIOTTA, C.; TOGNON, M.; MARTINI, F.  
20 Epigenetics of Male Infertility: The Role of DNA Methylation. **Frontiers in Cell and**  
21 **Developmental Biology**, v. 9, n. July, 2021.
- 22 SANCHES, E. A.; MARCOS, R. M.; BAGGIO, D. M.; TESSARO, L.; BALEN, R. E.;  
23 BOMBARDELLI, R. A. Estimativa da concentração espermática do sêmen de peixe  
24 pelo método de espermatócrito. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 6, p. 1163–  
25 1167, 2011.
- 26 SARMENTO, N. L. A. F.; MARTINS, E. F. F.; COSTA, D. C.; SILVA, W. S.; MATTIOLI,  
27 C. C.; LUZ, M. R.; LUZ, R. K. Effects of supplemental dietary vitamin C on quality of  
28 semen from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) breeders. **Reproduction in Domestic**  
29 **Animals**, v. 52, n. 1, p. 144–152, 2017.
- 30 SHARAFI, M.; BORGHEI-RAD, S. M.; HEZAVEHEI, M.; SHAHVERDI, A.; BENSON,  
31 J. D. Cryopreservation of Semen in Domestic Animals: A Review of Current  
32 Challenges, Applications, and Prospective Strategies. **Animals**, v. 12, n. 23, p. 1–24,  
33 2022.
- 34 SHOKR, E. A. M.; FATHY, A. EFFECT OF QUINALDINE SULFATE, CLOVE OIL AND  
35 TRICAINÉ METHANESULFONATE ANESTHESIA ON PHYSIOLOGICAL,  
36 BIOCHEMICAL PARAMETERS AND MORTALITY OF NILE TILAPIA (*Oreochromis*  
37 *niloticus*). **Abbassa International Journal for Aquaculture**, v. 11, n. 2, p. 223–240,  
38 2018.
- 39 SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W. F. Sperm Membrane Behaviour during  
40 Cooling and Cryopreservation. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**,  
41 v. 50 Suppl 3, p. 20–26, set. 2015.
- 42 SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W. F. Mode of Action of Cryoprotectants for  
43 Sperm Preservation. **Animal reproduction science**, v. 169, p. 2–5, jun. 2016.

- 1 SILVA, G. F.; MACIEL, L. M.; DALMAS, M. V.; GONÇALVES, M. T. **Tilapia-do-Nilo.**  
2 **Criação e cultivo em viveiros no estado do Paraná.** [s.l: s.n.]
- 3 SILVA, V. W.; APPEL, R. C.; SIQUEIRA, K. N.; VILAS BOAS, L. A.; PRETTO-  
4 GIORDANO, L. G.; FERNANDES, J. M. O.; BEIRÃO, J. S.; MARTINS, M. I. M. The  
5 use of antioxidant taurine for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) sperm  
6 cryopreservation. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 47, n. 3, p. 766–733,  
7 2023.
- 8 SUQUET, M.; DREANNO, C.; FAUVEL, C.; COSSON, J.; BILLARD, R.  
9 Cryopreservation of sperm in marine fish. **Aquaculture Research**, v. 31, n. 3, p. 231–  
10 243, 2000.
- 11 TAITSON, P. F.; CHAMI, E.; GODINHO, H. P. Gene banking of the neotropical fish  
12 *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836): A protocol to freeze its sperm in the field.  
13 **Animal Reproduction Science**, v. 105, n. 3–4, p. 283–291, 2008.
- 14 TAYLOR, P.; WATANABE, W. O.; LOSORDO, T. M.; FITZSIMMONS, K.; HANLEY, F.  
15 Tilapia Production Systems in the Americas : Technological Advances , Trends , and  
16 Challenges. *In: Reviews in Fisheries Science*. [s.l: s.n.]p. 465–498.
- 17 TURRA, E.; OLIVEIRA, D.; TEIXEIRA, E.; LUZ, R.; PRADO, S.; MELO, D.; FARIA, P.;  
18 SOUSA, A. Controle reprodutivo em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por meio  
19 de manipulações sexuais e cromossômicas. **Revista Brasileira de Reprodução**  
20 **Animal**, v. 1, n. 34, p. 21–28, 2010.
- 21 TUZINE, T. A. R.; FREITAS, R. T. F.; GAYA, L. G.; PAULA, D. A.; TUZINE, M. S.;  
22 FELIZARDO, V. O. Hormonal induction and synchronization in the reproduction of Nile  
23 tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Boletim de Indústria Animal**, v. 79, p. e1509, 2022.
- 24 UGWU, S. I.; KOWALSKA, A.; MORITA, M.; KOWALSKI, R. K. Application of glucose-  
25 methanol extender to cryopreservation of Mozambique tilapia (*Oreochromis*  
26 *mossambicus*) sperm. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 19, n.  
27 1, p. 41–50, 2019.
- 28 UN. World Population Prospects 2022 : Summary of Results Ten key messages.  
29 **United Nations , Department of Economic and Social Affairs , Population**  
30 **Division**, n. July 2022, p. 2–3, 2022.
- 31 VARELA JUNIOR, A. S.; JARDIM, R. D.; STREIT JR, D. P.; CARDOSO, T. F.; SILVA,  
32 E. F.; LUCIA, T. jr; FIGUELREDO, M.R.C. CORCINI, C. D. Trehalose in extenders for  
33 cryopreservation of Tambaqui (*Colossoma macropomum*) sperm. **Cryo-Letters**, v. 43,  
34 n. 5, p. 264–268, 2022.
- 35 VITULE, J. R. S.; FREIRE, C. A.; SIMBERLOFF, D. Introduction of non-native  
36 freshwater fish can certainly be bad. **Fish and Fisheries**, v. 10, n. 1, p. 98–108, 2009.
- 37 VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian  
38 freshwater fish species: A review. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 1, p.  
39 137–150, 2009.
- 40 VIVEIROS, A. T. M.; ORFÃO, L. H.; NASCIMENTO, A. F.; CORRÊA, F. M.;  
41 CANEPPELE, D. Effects of extenders, cryoprotectants and freezing methods on sperm  
42 quality of the threatened Brazilian freshwater fish pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus*  
43 (*Characiformes*). **Theriogenology**, v. 78, n. 2, p. 361–368, 2012. Disponível em:

- 1 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.02.015>>.
- 2 WADDINGTON, C. H. The epigenotype. **International journal of epidemiology**, v.  
3 41, p. 10–13, 1942.
- 4 WANKANAPOL, A. Cryopreservation of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)  
5 Spermatozoa : Technique and Management. **BURAPHA SCIENCE JOURNAL**, v. 25,  
6 n. 2, p. 735–753, 2020.
- 7 WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal**  
8 **Reproduction Science**, v. 60–61, p. 481–492, 2000.
- 9 YANG, Y.; LIU, D.; WU, L.; HUANG, W.; YANG, S.; XIA, J.; LIU, X.; MENG, Z.  
10 Comparative transcriptome analyses reveal changes of gene expression in fresh and  
11 cryopreserved yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) sperm and the effects of  
12 Cryoprotectant Me2SO. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.  
13 133, p. 457–465, 2019. Disponível em:  
14 <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.050>>.
- 15 YAVAŞ, İ.; BOZKURT, Y.; YILDIZ, C. Effect of different antioxidants on motility, viability  
16 and fertilizing capacity of cryopreserved scaly carp (*Cyprinus carpio*) semen. **The**  
17 **Israeli journal of aquaculture = Bamidgeh**, v. 66, maio 2014.
- 18 ZAJITSCHKEK, S.; HOTZY, C.; ZAJITSCHKEK, F.; IMMLER, S. Short-term variation in  
19 sperm competition causes sperm-mediated epigenetic effects on early offspring  
20 performance in the zebrafish. **Proceedings of the Royal Society B: Biological**  
21 **Sciences**, v. 281, n. 1785, 2014.
- 22 ZHANG, S.; CHENG, Y.; VĚCHTOVÁ, P.; BORYSHPOLETS, S.; SHAZADA, N. E.;  
23 ALAVI, S. M. H.; COSSON, J.; LINHART, O. Potential implications of sperm DNA  
24 methylation functional properties in aquaculture management. **Reviews in**  
25 **Aquaculture**, v. 15, n. 2, p. 536–556, 2023.
- 26 ZIMMERMANN, S.; FITZSIMMONS, K. Tilapicultura intensiva. *In*: **Cyrino, J. E. P.,**  
27 **Urbiniatti, E. C., Fracalossi, D. M., Castagnolli, C. Tópicos especiais em**  
28 **Psicultura de Água Doce Tropical Intensiva**. [s.l.: s.n.]p. 239–266.
- 29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43

**1 4 HIPÓTESE**

2 A criopreservação altera os padrões de metilação do DNA nos  
3 espermatozoides de tilápia do Nilo.

4

5

6

## 1 5 OBJETIVOS

### 2 5.1 OBJETIVO GERAL

3 Avaliar a influência da criopreservação no perfil de metilação do DNA  
4 em espermatozoides de tilápia do Nilo.

5

### 6 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

7 Avaliar a cinética espermática por meio do sistema CASA, de  
8 espermatozoides a fresco e pós descongelação;

9 Avaliar a morfologia (microscopia óptica) e integridade de membrana  
10 plasmática (microscópio de fluorescência) de espermatozoides a fresco e pós  
11 descongelação;

12 Avaliar a metilação do DNA em espermatozoides a fresco e  
13 descongelados pelo método RRBS (Sequenciamento de Bissulfito de Representação  
14 Reduzida).

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

1 **6ARTIGO A – Artigo nos moldes da revista Criobiology:**

2  
3 <https://www.sciencedirect.com/journal/cryobiology/publish/guide-for-authors>

4  
5  
6 **Cryopreservation influence on DNA methylation profile in Nile tilapia (*Oreochromis***  
7 ***niloticus*) spermatozoa**

8 Myrian Megummy Tsunokawa Hidalgo<sup>1</sup>, Douglas Martins Ceconello<sup>1</sup>, Renan Cassaroto  
9 Appel<sup>2</sup>, Vinicius Wagner Silva<sup>1</sup>, Lorena Maria Rudnik<sup>4</sup>, Partha Sarathi Tripathy<sup>2,3</sup>, Laurival  
10 Antônio Vilas Boas<sup>4</sup>, Lucienne Garcia Pretto Giordano<sup>1</sup>; Jorge Manuel de Oliveira  
11 Fernandes<sup>2</sup>, Maria Isabel Mello Martins<sup>1\*</sup>.

12 <sup>1</sup> Center of Agrarian Sciences – State University of Londrina, Paraná, Brazil

13 <sup>2</sup> Faculty of Bioscience and Aquaculture – Nord University, Bodø, Norway

14 <sup>3</sup> College of Fisheries, Rani Lakshmi Bai Central Agricultural University, Jhansi, India

15 <sup>4</sup> Center of Biological Sciences – State University of Londrina, Paraná, Brazil

16 \*e-mail: [imartins@uel.br](mailto:imartins@uel.br)

17  
18 **Abstract**

19 Sperm are extensively utilized for cryopreserving valuable genetic resources in aquaculture. It  
20 is understood that fish sperm not only convey their genetic information to the embryo but also  
21 their epigenetic profile, notably DNA methylation. Consequently, any change in the DNA  
22 methylation profile within sperm induces the risk of transmitting epigenetic modifications to  
23 offspring. The study aimed to evaluate the effect of cryopreservation on DNA methylation in  
24 Nile Tilapia sperm. Six animals were used, kept in a 1500 liter aquaculture recirculation system  
25 (RAS), with a temperature between 27 and 30°C. The animals were previously anesthetized and  
26 the samples were collected by abdominal massage. The ejaculate was kept at 4°C until the  
27 analysis began. To analyze sperm kinetics, the sample was activated with water from the tank  
28 at 27-30°C in a ratio of 1:10 and 3 µL were deposited on a Cell-Vu® slide and after ten seconds  
29 evaluated by the CASA system (SCA® (SCA® - Sperm Class Analyzer) with setup for fish.  
30 For cryopreservation, the sample was diluted in a 1:3 ratio in a extender composed of ionic  
31 extender (75mMol L<sup>-1</sup> NaCl; 70mMol L<sup>-1</sup> KCl; 2mMol L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>; 1mMol L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> and  
32 20mMol L<sup>-1</sup> Tris – pH = 8.0), with methanol cryoprotectant (10%) and taurine antioxidant  
33 (1mMoL). For DNA extraction a DNeasy® blood and tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany)  
34 was used and DNA digestion with MspI, library preparation and bisulfite conversion was  
35 performed by Zymo-Seq RRBS Library Kit. Our study demonstrated a decline in sperm motility  
36 alongside a rise in the incidence of sperm abnormalities following sperm cryopreservation.  
37 Furthermore, cryopreservation triggered both hypomethylation and hypermethylation  
38 depending on the methylation differentiation sites (DMCs). Therefore, further exploring sperm  
39 DNA methylation at the genetic scale in fish will be an important issue in reproductive  
40 biotechnologies to ensure the safety of offspring epigenetic traits.

41 **Keywords:** biotechnology, epigenetic, gamete, fish.

## 1 **1 Introduction**

2           The Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is a highly-produced aquaculture species  
3 worldwide [1]. The species is endemic to Africa, but most of its production comes from outside  
4 Africa, with China and Indonesia leading the majority of its production [2].

5           Along with the rapid development and alterations of aquaculture, there are more  
6 challenges in breeding selection, livestock management and farming optimization. Fertilization  
7 success, embryo quality and performance of the offspring are highly dependent on the integrity  
8 of the gametes [3].

9           In all animals, spermatozoa quality parameters are determinants of male fertility, and  
10 are directly associated with fertilization, hatching and malformation rate [4]. Cryopreservation  
11 is a widely utilized biotechnique, yet its impact on the sperm epigenome remains under  
12 investigation [12]. This technology is employed for preserving valuable genetic resources, and  
13 it is primordial that cryopreserved sperm retain their capacity to fertilize eggs and produce  
14 offspring that accurately reflect the characteristics of the preserved resource. However, few  
15 studies have specifically addressed the potential damage to progeny resulting from the use of  
16 cryopreserved sperm [11].

17           Previous studies report a relationship between spermatozoa quality parameters and  
18 changes of the DNA methylation pattern [5–8]. Due to the importance of DNA methylation in  
19 sperm for embryonic development, the stability of this epigenetic mark is often questioned with  
20 regard to assisted reproductive technologies in mammals or fish [6,9,10]. It remains unclear  
21 whether these practices could potentially change the pre-existing epigenetic pattern in sperm  
22 and what risks may arise for offspring transmission [11].

23           In fish, sperm cryopreservation mainly depends on the use of cryoprotectants  
24 containing reactive methyl groups, and these chemicals are known to promote DNA  
25 methylation in vitro [13]. Therefore, there must be a risk that cryopreservation will increase the  
26 level of DNA methylation. Studies describe complex effects associated with the different

1 species and cryoprotectants used. In yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [14]. In tambaqui  
2 (*Colossoma macropomum*) [15]. In goldfish (*Carassius auratus*) and zebrafish (*Danio rerio*),  
3 [11]. In rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [16]. In all cases, verifying the epigenetic  
4 stability of sperm in response to technological treatment is essential to assess the risk assumed  
5 for the safety of the progeny [11].

6 To evaluate DNA methylation at the whole-genome level, reduced representation  
7 bisulfite sequencing (RRBS) can be utilized [8,17,18]. RRBS involves endonuclease  
8 fractionation of DNA and cuts genomic DNA at specific restriction sites, examining a reduced  
9 CpG fraction deemed representative of the whole genome [17]. Importantly, RRBS reduces  
10 data volume compared to whole-genome sequencing, requiring less storage and computational  
11 power. This facilitates cost-effective analysis of numerous biological replicates, crucial for  
12 evaluating sample variability [8].

13 Indeed, cryopreservation of gametes provides an effective method for hatchery  
14 reproduction to biologically protect endangered species and to make a gene bank of genetic  
15 resources. However, To our knowledge, there are no studies that have investigated whether the  
16 cryopreservation affect the DNA methylation of Nile Tilapia Spermatozoa.

17 Thus, the aim of this study was to evaluate the influence of cryopreservation on sperm  
18 quality and epigenetics of Nile Tilapia spermatozoa.

## 19 **2Material and Methods**

### 20 *2.1 Ethical aspects*

21 The study was conducted in accordance with the Research Council of Norway (no.  
22 310103).

23

### 24 *2.2 Animals and experimental design*

25 Sexually mature male Nile tilapia (n = 6) aged 2.5 years and weighing between 3.7 to  
26 4.6 kg, were employed for this study. All males were housed in a 1500L tank within a

1 Recirculating Aquaculture System (RAS), maintaining water temperatures between 27-30°C.  
2 The animals were fed a commercial diet with 30% crude protein twice daily, administered via  
3 an automatic system.

4 For sperm collection, the fish underwent anesthesia by immersion in water containing  
5 a 120ppm solution of clove oil (Sigma-Aldrich, USA). Post-anesthesia, the abdomen and  
6 urethral papillae of the fish were meticulously dried with paper towels to avoid contamination  
7 from urine, mucus, blood, and feces. Sperm was collected by gentle abdominal massage and  
8 transferred to an eppendorf tube (1.5mL). Uncontaminated samples were stored in a rack on ice  
9 (4°C) until further assessment.

10 On the first step, the first sample evaluation was carried out; only samples without  
11 contamination and without motility were included in the study. Then the semen was activated  
12 and only samples >80% were included in the study. In the second step, the semen was diluted  
13 in an ionic extender, the samples were evaluated (sperm kinetics, sperm concentration, plasma  
14 membrane integrity and sperm morphology) and frozen. At another time, the samples were  
15 thawed and evaluated again (sperm kinetics, sperm concentration, plasma membrane integrity  
16 and sperm morphology). In the third step, DNA extraction and evaluation of the DNA  
17 methylation profile of Nile tilapia sperm were carried out. (Figure 1).

18

## 19 *2.3 Sperm Evaluation*

### 20 *2.3.1 Kinetic parameters*

21 Kinetic analysis was conducted by SCA® system (Sperm Class Analyzer, Microtic  
22 S.L, Spain) with the setup for fish (frame rate: 50fps, number of images: 25; analysis area:  
23 2µm<sup>2</sup>; drift speed: 10 µm/s). The sperm were activated with tank water at a temperature of 27-  
24 30°C in a ratio of 1:10 (sperm/tank water). Subsequently, 3µL of sperm was placed into a pre-

1 heated (27°C) CELL-VU® chamber (Millennium Sciences Inc., USA). Three fields were  
2 selected on both sides of the chamber for each analysis.

3 The SCA system evaluated the following parameters: motility (% - TM); progressive  
4 motility (% - PM); rapid cells (%); medium cells (%); slow cells(%); static cells (%) average  
5 path velocity ( $\mu\text{m/s}$  – VAP); straight velocity ( $\mu\text{m/s}$  – VSL); curvilinear velocity ( $\mu\text{m/s}$  – VCL);  
6 amplitude of lateral displacement of the sperm head ( $\mu\text{m}$  – ALH); beat frequency (Hz – BCF);  
7 straightness (% - STR); linearity (% - LIN), and oscillation index (% - WOB). For the trial, only  
8 samples exhibiting more than 80% of motility were included in this study.

9 All samples were conducted by the same technician and evaluated fresh and after  
10 thawed.

### 11 2.3.2 Sperm morphology, membrane integrity and sperm concentration

12 For sperm morphology analyses, smear was performed with 3  $\mu\text{L}$  of semen with 3  $\mu\text{L}$   
13 of eosin/nigrosin supravital dye (BotuVital-Botupharma®, Botucatu, SP, Brazil) on a glass  
14 slide (Precision Glass Line). After 5 minutes, the reading was performed, with a count of 200  
15 cells at 100x magnification, under an optical microscope (Olympus®, CX31, Tokyo, Japan).

16 To evaluate sperm viability, it was used two fluorescent dyes, SYBR® green (Life  
17 technologies™, USA), and Propidium Iodide (PI) (Life technologies™, USA). After preparing  
18 the working solution 0,5 $\mu\text{L}$  of SYBR® green was added to the sample and incubated for one  
19 minute, after that, 2,5 $\mu\text{L}$  of PI was added to the sample and incubated for one minute more.  
20 Both dye incubation was performed in a rack of ice and in the dark. After the preparation, 3 $\mu\text{L}$   
21 of the sample was placed on a glass slide and covered with a coverslip. The analyses were  
22 performed by a fluorescent microscope (Leica DM4000B, Germany) at magnification of 400x  
23 and 300 cells were counted. Cells emitting green fluorescence were deemed viable, whereas  
24 those emitting yellow/red fluorescence were classified as non-viable. All samples were  
25 conducted by the same technician and evaluated fresh and after thawing.

1 To determine sperm concentration, a solution was prepared at a ratio of 1:200 in  
2 distilled water. Following homogenization, 20 $\mu$ L of the solution was distributed onto both sides  
3 of Neubauer® chamber. Spermatozoa were then counted and expressed in spermatozoa/mL.  
4 All analyses were conducted by the same technician.

#### 5 *2.4 Sperm Cryopreservation*

6 Following evaluation of spermatozoa, sperm samples were kept at 4°C until dilution.  
7 Sperm samples were divided into two groups: fresh (control group) and thawed diluted at a ratio  
8 of 1:3 with a ionic extender (75mmol L<sup>-1</sup> NaCl; 70mmol L<sup>-1</sup> KCl; 2mmol L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>; 1mmol L<sup>-1</sup>  
9 <sup>1</sup> MgSO<sub>4</sub> and 20mmol L<sup>-1</sup> Tris – pH = 8,0), which contained methanol 10% (cryoprotectant)  
10 and taurine 1mM (antioxidant) [19]. The samples were filled in a french straw (0.5mL, cut in  
11 half), and sealed with polyvinyl alcohol. Triplicates were prepared for each male.

12 The straws were first kept at a refrigerator temperature (4°C) for 30 minutes.  
13 Subsequently, they were positioned on a 6 cm surface within a 4 cm column of liquid nitrogen  
14 (LN2) for 10 minutes and then plunged into LN2. Afterward, the straws were stored in a  
15 cryotank until further analysis. The straws were thawed in a water bath at 30°C for 30 seconds.  
16 Following thawing, kinetic and membrane integrity parameters were evaluated.

#### 17 *2.5 Statistical Analysis*

18 The data were submitted to the Shapiro-Wilk and the Levene test to assure its normal  
19 distribution and homogeneity, respectively. To compare the groups, a Paired t-test was  
20 performed using Sigma Plot 14.0, with the significance level at P<0.05.

#### 21 *Sperm DNA methylation*

##### 22 *2.6.1 DNA extraction*

23 For DNA extraction a DNeasy® blood and tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) was  
24 used, according to instructions provided by the manufacturer. Briefly, in a 1.5mL

1 microcentrifuge tube were added 180 $\mu$ L Buffer ATL and 20 $\mu$ L proteinase K, the samples were  
2 incubated at 56°C until completely lysed. After that, 200 $\mu$ L Buffer AL was added in the same  
3 tube and incubated at 56°C/10m. Then, in the same tube was added 200 $\mu$ L ethanol and the tube  
4 mixture was pipetted into DNeasy mini spin column and centrifuged. Following, in a new  
5 collection tube was added 500 $\mu$ L Buffer AW2, centrifuged and the spin column was transferred to  
6 a new microcentrifuge tube. In the last step, 50 $\mu$ L Buffer AE was added to the center of the spin  
7 column membrane, incubated for 1 min (15-25°C) and centrifuged. This step was repeated.

8 DNA concentration was determined by the Qubit™ dsDNA quantification (Invitrogen  
9 by Thermo Fisher Scientific) and its DNA Genomic quality was determined by Genomic DNA  
10 Screen Tape (Agilent Technologies, California, USA).

#### 11 *2.6.2 RRBS library preparation and sequencing*

12 DNA digestion with MspI, library preparation and bisulfite conversion were performed  
13 by Zymo-Seq RRBS Library Kit (Zymo Research, California, USA) according to instructions  
14 provided by the manufacturer. After library preparation, its quality was determined by High  
15 sensitivity D1000 Screen Tape (Agilent Technologies, California, USA). All libraries were  
16 pooled, adjusted to a concentration of 5ng/ $\mu$ L and sequenced by Novogene company (UK).

#### 17 *2.6.3 RRBS data processing*

##### 18 *Quality Control and Preprocessing*

19 Initial quality control of raw FASTQ files was conducted using FastQC v0.11.9,  
20 allowing for the assessment of basic quality metrics, including base quality score distributions,  
21 sequence quality scores, and GC content. Subsequent trimming of adapter sequences and low-  
22 quality bases was performed using Trim Galore v0.6.6, with parameters set to remove adapters  
23 automatically and trim low-quality bases (< Q20) for RRBS data.

## 1 *Bisulfite Sequencing Data Processing*

2           Bismark v0.22.3 was utilized for alignment of bisulfite-treated reads to reference  
3 genome *O\_niloticus\_UMD\_NMBU* (NCBI WGS Accession no. MKQE02). Bismark performs  
4 bisulfite read mapping and methylation calls simultaneously. Initially the bisulfite conversion  
5 of the reference genome using Bismark's genome preparation command was done. Following  
6 this, single-end reads were aligned to bisulfite-converted genome using Bismark's default  
7 parameters, which include a stringent alignment scoring scheme optimized for bisulfite  
8 sequencing data to ensure high-confidence mapping results.

## 9 *Deduplication, Methylation Extractor, and Quality Control*

10           Post-alignment, Bismark's deduplication module was employed to remove potential  
11 PCR duplicates, ensuring that only unique conversion events were analyzed. The methylation  
12 extractor feature of Bismark was used to parse aligned sequence data, extracting methylation  
13 states for individual cytosines across the genome and compiling this information into  
14 comprehensive reports and coverage files. Quality control metrics for alignment, including  
15 mapping efficiency, duplication rates, and cytosine methylation context (CG, CHG, CHH),  
16 were reviewed to assess data integrity and alignment performance. Bismark methylation report  
17 provided an overview of the methylation landscape for each sample, facilitating comparisons  
18 across different conditions and sexes.

## 19 *Differential Methylation Analysis*

20           Differential methylation analysis was conducted using the MethylKit package v1.14.0  
21 in R. This involved comparing methylation levels between fresh and thawed groups, to identify  
22 differentially methylated positions (DMPs) and regions (DMRs). Parameters were set to  
23 identify sites with a minimum methylation difference of 25% and a q-value threshold of 0.05,  
24 indicating statistically significant differences in methylation. The differentially methylated

1 positions were annotated using genomation package v1.34.0 in R. The plots for the data were  
2 generated using ggplot 2 in R.

### 3 **3Results**

4 The average sperm concentration was  $3.26 \times 10^9$  ( $2.7- 3.8 \times 10^9$ ) spermatozoa/mL.

5 The results of sperm morphology and membrane integrity indicated a significant  
6 difference between groups Fresh (F) and Thawed (T) for all parameters: major defects  
7 ( $P<0.001$ ), minor defects ( $P=0.008$ ), total defects ( $P<0.001$ ) and membrane integrity ( $P<0.001$ ).  
8 The most frequent morphological changes observed in cryopreserved Nile tilapia sperm were  
9 macrocephaly ( $20.66 \pm 1.20\%$ ), degenerated head ( $13.66 \pm 1.52$ ), strongly curled tail ( $6.33 \pm$   
10  $0.42\%$ ), abnormal loose head ( $5.16 \pm 0.65\%$ ) and microcephaly ( $2.33 \pm 0.21$ ). Regarding the  
11 kinetic parameters, a significant difference was observed for: TM ( $P<0.001$ ), PM ( $P<0.001$ ),  
12 ALH ( $P=0.008$ ), STR ( $P=0.012$ ), LIN ( $P=0.007$ ), WOBBLE ( $P<0.001$ ), RAPID cells  
13 ( $P=0.003$ ), MEDIUM cells ( $P=0.001$ ) and STATIC cells ( $P=0.006$ ) (Table 1).

14 Regarding RRBS analysis, the total trimmed reads identified were F: 39.47 to 47-63x10<sup>6</sup>  
15 and T: 26.45 to 47.61 x10<sup>6</sup>. Of all cytosines identified in CpG sites, the values found represent  
16 F: 59.3 to 69.2% and T: 61.5 to 67.7% of genomic cytosines in CpG sites (Table 2).

17 We compared global DNA methylation of fresh and cryopreserved sperm (Figure 1).  
18 When comparing the Fresh (F) and Thawed (T) groups, it was observed that the fresh group  
19 produced different DNA methylation levels than the thawed one in all contexts: CpG ( $P<0.001$ );  
20 CHH ( $P<0.001$ ) and CHG ( $P<0.001$ ). In an individual descriptive analysis of each male, when  
21 sperm samples were cryopreserved in animal 1 (F: 65.2% x T: 66.8), animal 2 (F: 55.9% x T:  
22 61.5%), animal 4 (F: 63% x T: 64.9%), animal 5 (F: 59.3% x T: 65.1%), a significant increase  
23 in global DNA methylation was observed compared to the control group (F). On the other hand,  
24 in animals, 3 (F: 67.7% x T: 67.7%) and 6 (69.2% x 66.5%), cryopreserved sperm produced  
25 DNA methylation levels similar and lower to the control group (F), respectively (Figure 2).

1           In a further analysis of the data, instead of using only the average methylation ratio of  
2 each group, we compared all the samples to each other based on the methylation ratio of every  
3 sequenced cytosine (PCA, Figure 3). The groups close to each other in the plot have very close  
4 methylation level. Only two samples were distant from the others, but they did not share any  
5 treatment similarities (Fish 1 thawed and Fish 6 thawed). Their separation from the others can  
6 be explained by the lower number of cytosines in CpG sites of these specific samples.

7           There are very few differentially methylated regions, and the difference were calculated  
8 as thawed-control. We found 28 of these potentially sensitive regions. The cryopreservation  
9 triggered both hypomethylation and hypermethylation depending on the methylation  
10 differentiation sites (DMCs) (Figure 4). This emphasizes the fact that cryopreservation did not  
11 trigger a homogeneous effect in all the males, and that sperm cryopreservation impact on DNA  
12 methylation was different.

#### 13 **4Discussion**

14           Our research demonstrated a decline in sperm motility alongside a rise in the incidence  
15 of sperm abnormalities following sperm cryopreservation, suggesting a significant vulnerability  
16 of sperm to cryopreservation. Although the evaluation of sperm pattern after cryopreservation  
17 was not the scope of this study, the findings found deserve some comments, since few studies  
18 have explored the impact of cryopreservation on sperm quality parameters in Nile tilapia. To  
19 our knowledge, this is the first investigation to delineate sperm morphology and DNA  
20 methylation in cryopreserved sperm in this species.

21           The average sperm concentration observed in this study was within the range described  
22 for Nile tilapia, which ranged from 2.63 to 8.19 x 10<sup>9</sup> sperm/mL [20–22]. The sperm motility  
23 of fresh semen in this study (92.03%) was similar to the value reported by Almeida. [22] in  
24 fresh semen of different strains of Nile tilapia (Supreme: 89.06%; Aquabel: 90.32% and  
25 Chitralada: 97.94%), however the authors do not describe post-thawing motility values. In the

1 study by Bozkurt. [23], the authors described that the average post-thawing motility of Nile  
2 tilapia sperm was  $48.9 \pm 8.1\%$ , considering three cryoprotectants (Glycerol, Methanol and  
3 DMSO), while the mean highest motility was determined in spermatozoa cryopreserved with  
4 10% glycerol ( $60.3 \pm 1.8\%$ ). These findings are similar to ours ( $66.87 \pm 2.31\%$ ), when,  
5 spermatozoa were cryopreserved with 10% methanol. The percentage of normal cells in our  
6 study ( $42.66 \pm .0.95$ ) was different from that described in Silver catfish ( $21.48 \pm 0.95\%$ ) [24],  
7 However, despite the difference in species, the most frequent morphological changes  
8 highlighted by Costa [24] in Silver catfish (macrocephaly and strongly curled tail) were also  
9 found in a higher percentage in our study.

10 The RRBS method used in this study produced a limited number of cytosines at CpG  
11 sites, and this reduced data set enabled the use of many biological replicates to explore the  
12 impact of sperm cryopreservation on DNA methylation. Our results demonstrated that  
13 cryopreservation had a direct impact on DNA methylation, that is, it produced some DMCs  
14 between fresh and cryopreserved sperm. Furthermore, supposed regions that would be more  
15 sensitive to cryopreservation were proposed. However, although we identified potential  
16 sensitive regions in which several cytosines showed methylation changes. We cannot yet say  
17 whether some of these regions are related to promoter regions of genes that are involved in  
18 specific embryogenesis processes.

19 Our study revealed that cryopreservation triggered both hypomethylation and  
20 hypermethylation depending on the methylation differentiation sites (DMCs). As well as our  
21 analyses, other studies have shown controversial results on the pattern of methylation after  
22 cryopreservation. In Tambaqui sperm (*Colossoma macropomum*), regardless of the  
23 cryoprotectants tested (MeOH, DMSO, glycerol), cryopreservation induced DNA  
24 hypomethylation [15]. In goldfish (*Carassius auratus*), DNA methylation was not affected after  
25 sperm cryopreservation with MeOH, whereas others cryoprotectants (DMSO and 1,2-

1 propanediol) decreased DNA methylation. In contrast, in zebrafish (*Danio rerio*) , sperm  
2 cryopreservation with MeOH induced a slight, but significant, increase in DNA  
3 methylation[11]. In rainbow trout, DNA methylation was only slightly changed after sperm  
4 cryopreservation, regardless of the cryoprotectant used (glycerol, MeOH, or DMSO) [8]. On  
5 the other hand, studies conducted on control sperm samples frozen without cryoprotectant  
6 revealed no change in sperm DNA methylation, despite a significant reduction in cellular  
7 integrity. Additionally, preliminary experiments (not shown) indicated that exposure of fresh  
8 spermatozoa to cryoprotectant did not affect sperm DNA methylation, suggesting that the  
9 observed changes in DNA methylation are not directly caused by the cryoprotectant alone [11].

10 This condition, creates a gap in relation to the global effect of cryopreservation. Due to  
11 the quiescent state of sperm chromatin, it is likely that changes in methylation were mediated  
12 by the enzymes responsible for adding methyl groups to DNA (DNMTs) and removing these  
13 groups (via TET) [8]. However, the freezing-thawing process of sperm is too sudden to allow  
14 these enzymes to efficiently catalyze methylation or demethylation reactions. Therefore, the  
15 hypomethylations and hypermethylations observed in our study, can be justified from the direct  
16 and chemical impact on DNA methylation during the cryopreservation process.

17 Regarding the small changes obtained after cryopreservation in our study, if offspring  
18 inherit the changed sperm DNA methylation pattern due to the lack of a repair mechanism, and  
19 if the affected genes are essential for embryonic development, this should induce some  
20 increased embryonic mortality. This reinforces the importance of the present study, which  
21 sought information in spermatozoa whether some important genomic locations would be  
22 repeatedly and consistently affected by cryopreservation.

23

## 24 **Conclusion**

25 Sperm cryopreservation changed the DNA methylation profile in Nile Tilapia sperm.  
26 Therefore, further exploring sperm DNA methylation at the genetic scale in fish will be an

1 important issue in reproductive biotechnologies to ensure the safety of offspring epigenetic  
2 traits.

### 3 **Author Contributions**

4 **Myrian Megummy Tsunokawa Hidalgo:** Resources, Data Curation, Project administration,  
5 Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing; **Douglas Martins Ceconello:**  
6 Methodology; **Renan Cassaroto Appel:** Methodology; **Vinicius Wagner Silva:** Methodology;  
7 **Lorena Maria Rudnik:** Methodology; **Partha Sarathi Tripathy:** Methodology,  
8 bioinformatic; **Laurival Antônio Vilas Boas:** Project administration, Supervision; **Lucienne**  
9 **Garcia Pretto Giordano:** Project administration, Supervision; **Jorge Manuel de Oliveira**  
10 **Fernandes:** Project administration, Supervision, Writing - Review & Editing; **Maria Isabel**  
11 **Mello Martins:** Project administration, Supervision, Writing - Review & Editing.

### 12 **Acknowledgments**

13 To the Research Council of Norway (project nº 310103) for collaboration and  
14 scholarship by the Norbraqua project. To the Coordination for the Improvement of Higher  
15 Education Personnel (CAPES) for the scholarship.

### 16 **References**

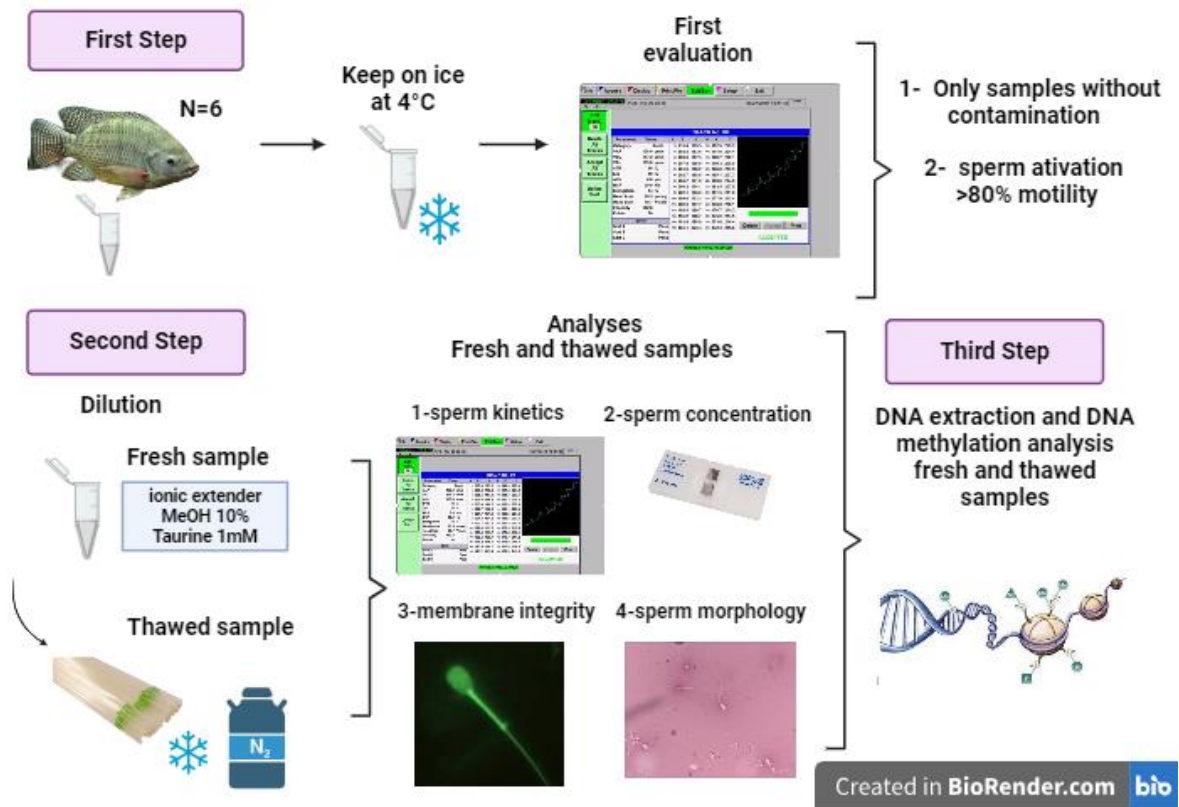
- 17 [1] R.L. Naylor, R.W. Hardy, A.H. Buschmann, S.R. Bush, L. Cao, D.H. Klinger, D.C.  
18 Little, J. Lubchenco, S.E. Shumway, M. Troell, A 20-year retrospective review of  
19 global aquaculture, *Nature* 591 (2021) 551–563. [https://doi.org/10.1038/s41586-021-](https://doi.org/10.1038/s41586-021-03308-6)  
20 [03308-6](https://doi.org/10.1038/s41586-021-03308-6).
- 21 [2] N.A.G. Moyo, M.M. Rapatsa, A review of the factors affecting tilapia aquaculture  
22 production in Southern Africa, *Aquaculture* 535 (2021) 736386.  
23 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736386>.

- 1 [3] S. Zhang, Y. Cheng, P. Věchtová, S. Boryshpolets, N.E. Shazada, S.M.H. Alavi, J.  
2 Cosson, O. Linhart, Potential implications of sperm DNA methylation functional  
3 properties in aquaculture management, *Rev. Aquac.* 15 (2023) 536–556.  
4 <https://doi.org/10.1111/raq.12735>.
- 5 [4] C.L. Treviño, G. Orta, D. Figueiras-Fierro, Cl channels and transporters in sperm  
6 physiology, in: Sawada H, Inoue N, Iwano M. *Sex. Reprod. Anim. Plants.*, 2014: pp.  
7 59–84. doi:10.1007/978-4-431-54589-7\_6.
- 8 [5] A. Botezatu, R. Socolov, D. Socolov, I.V. Iancu, G. Anton, Methylation pattern of  
9 methylene tetrahydrofolate reductase and small nuclear ribonucleoprotein polypeptide  
10 N promoters in oligoasthenospermia: A case-control study, *Reprod. Biomed. Online* 28  
11 (2014) 225–231. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.10.010>.
- 12 [6] T.G. Jenkins, E.R. James, D.F. Alonso, J.R. Hoidal, P.J. Murphy, J.M. Hotaling, B.R.  
13 Cairns, D.T. Carrell, K.I. Aston, Cigarette smoking significantly alters sperm DNA  
14 methylation patterns, *Andrology* 5 (2017) 1089–1099.  
15 <https://doi.org/10.1111/andr.12416>.
- 16 [7] D. Montjean, A. Zini, C. Ravel, S. Belloc, A. Dalleac, H. Copin, P. Boyer, K.  
17 McElreavey, M. Benkhalifa, Sperm global DNA methylation level: Association with  
18 semen parameters and genome integrity, *Andrology* 3 (2015) 235–240.  
19 <https://doi.org/10.1111/andr.12001>.
- 20 [8] M. El Kamouh, A. Brionne, A. Sayyari, A. Laurent, C. Labbé, Cryopreservation effect  
21 on DNA methylation profile in rainbow trout spermatozoa, *Sci. Rep.* 13 (2023) 1–14.  
22 <https://doi.org/10.1038/s41598-023-44803-2>.
- 23 [9] C. Labbé, V. Robles, M.P. Herraéz, Epigenetics in fish gametes and early embryo,  
24 *Aquaculture* 472 (2017) 93–106. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.026>.

- 1 [10] I. Donkin, R. Barrès, Sperm epigenetics and influence of environmental factors, *Mol.*  
2 *Metab.* 14 (2018) 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.02.006>.
- 3 [11] A. Depincé, A. Gabory, K. Dziewulska, P.Y. Le Bail, H. Jammes, C. Labbé, DNA  
4 methylation stability in fish spermatozoa upon external constraint: Impact of fish  
5 hormonal stimulation and sperm cryopreservation, *Mol. Reprod. Dev.* 87 (2020) 124–  
6 134. <https://doi.org/10.1002/mrd.23297>.
- 7 [12] A. Chatterjee, D. Saha, H. Niemann, O. Gryshkov, B. Glasmacher, N. Hofmann,  
8 Effects of cryopreservation on the epigenetic profile of cells, *Cryobiology* 74 (2017) 1–  
9 7. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.12.002>.
- 10 [13] K. Kawai, Y.S. Li, M.F. Song, H. Kasai, DNA methylation by dimethyl sulfoxide and  
11 methionine sulfoxide triggered by hydroxyl radical and implications for epigenetic  
12 modifications, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 260–265.  
13 <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.10.124>.
- 14 [14] Y. Yang, D. Liu, L. Wu, W. Huang, S. Yang, J. Xia, X. Liu, Z. Meng, Comparative  
15 transcriptome analyses reveal changes of gene expression in fresh and cryopreserved  
16 yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) sperm and the effects of Cryoprotectant  
17 Me<sub>2</sub>SO, *Int. J. Biol. Macromol.* 133 (2019) 457–465.  
18 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.050>.
- 19 [15] F. de Mello, J.S. Garcia, L.C. Godoy, A. Depincé, C. Labbé, D.P. Streit, The effect of  
20 cryoprotectant agents on DNA methylation patterns and progeny development in the  
21 spermatozoa of *Colossoma macropomum*, *Gen. Comp. Endocrinol.* 245 (2017) 94–101.  
22 <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.06.003>.
- 23 [16] M. El-kamouh, Analysis of DNA methylation in rainbow trout spermatozoa: the  
24 strengths and limitations of RRBS, (2023) 1–17.

- 1 [17] A. Meissner, A. Gnirke, G.W. Bell, B. Ramsahoye, E.S. Lander, R. Jaenisch, Reduced  
2 representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation  
3 analysis, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) 5868–5877. <https://doi.org/10.1093/nar/gki901>.
- 4 [18] A. Meissner, T.S. Mikkelsen, H. Gu, M. Wernig, J. Hanna, A. Sivachenko, X. Zhang,  
5 B.E. Bernstein, C. Nusbaum, D.B. Jaffe, A. Gnirke, R. Jaenisch, E.S. Lander, Genome-  
6 scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells, *Nature* 454 (2008)  
7 766–770. <https://doi.org/10.1038/nature07107>.
- 8 [19] V.W. Silva, R.C. Appel, K.N. Siqueira, L.A. Vilas Boas, L.G. Pretto-Giordano, J.M.O.  
9 Fernandes, J.S. Beirão, M.I.M. Martins, The use of antioxidant taurine for Nile tilapia  
10 (*Oreochromis niloticus*) sperm cryopreservation, *Rev. Bras. Reprodução Anim.* 47  
11 (2023) 766–733.
- 12 [20] R.A. Bombardelli, C. Hayashi, M.R.M. Natali, E.A. Sanches, P.A. Piana, Níveis de  
13 energia digestível sobre os desempenhos reprodutivo e zootécnico e a deposição de  
14 lipídios nos hepatócitos de machos de tilápia do Nilo, *Rev. Bras. Zootec.* 39 (2010)  
15 941–949. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982010000500001>.
- 16 [21] M. Mataveli, G.V. De Moraes, D.P.S. Junior, R.P. Ribeiro, E. Gasparino, Qualidade do  
17 sêmen em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), alimentadas com dietas contendo  
18 diferentes níveis de vitamina C, *Acta Sci. - Anim. Sci.* 32 (2010) 345–349.  
19 <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v32i3.7836>.
- 20 [22] D.B. Almeida, M.A.P. Costa, L.N. Bassini, C.I.P. Calabuig, C.G. Moreira, M.D.N.  
21 Rodrigues, A.S.V. Junior, C.D. Corcini, M.E.B. Dode, H.L.M. Moreira, Sperm  
22 evaluation in strains of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, *J. Adv. Agric.* 6 (2016)  
23 933–941. <https://doi.org/10.24297/jaa.v6i2.5376>.
- 24 [23] Y. Bozkurt, İ. Yavaş, M.N. Bucak, D. Yeni, Effect of different cryoprotectants

- 1 (Glycerol, methanol and dimethyl sulfoxide) on post-thaw quality, viability,  
2 fertilization ability and dna damage of cryopreserved Nile tilapia (*Oreochromis*  
3 *niloticus*) spermatozoa, *Cryo-Letters* 40 (2019) 11–17.
- 4 [24] B.B. da Costa, L.S. Marques, P.G. Lassen, R.B. Rodrigues, D.P. Streit,  
5 Cryopreservation-induced morphological changes in the sperm of South American  
6 silver catfish (*Rhamdia quelen*), *J. Appl. Ichthyol.* 35 (2019) 987–993.  
7 <https://doi.org/10.1111/jai.13928>.
- 8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19



1

2 **Figure 1** Overview experimental design. First step: sperm collection and sperm analysis. Second step:  
 3 sperm dilution, freezing of samples and analysis. Third step: DNA extraction and DNA methylation  
 4 analysis.

5

6

7

8

9

10

11

12

13

1 **Table 1** Sperm morphology, membrane integrity and kinetic parameters of Nile tilapia, in samples  
 2 collected by abdominal massage (mean  $\pm$  standard deviation)

PARAMETERS	GROUPS		
	FRESH	THAWED	P
Total Normal cells (%)	65.66 $\pm$ 2.12	42.66 $\pm$ 0.95	<0.001
Major Defects (%)	29.66 $\pm$ 1.62	46.33 $\pm$ 0.95	<0.001
Minor Defects (%)	4.66 $\pm$ 1.20	11.00 $\pm$ 0.68	0.008
Total Defects (%)	34.33 $\pm$ 2.12	57.33 $\pm$ 0.95	<0.001
Membrane integrity (%)	93.33 $\pm$ 0.49	66.16 $\pm$ 1.97	<0.001
TM (%)	92.03 $\pm$ 1.50	66.87 $\pm$ 2.31	<0.001
PM (%)	51.18 $\pm$ 2.45	25.41 $\pm$ 3.68	<0.001
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	47.04 $\pm$ 1.66	43.88 $\pm$ 2.43	0.365
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	33.42 $\pm$ 2.28	40.07 $\pm$ 2.70	0.087
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	64.56 $\pm$ 4.66	51.14 $\pm$ 2.91	0.093
ALH ( $\mu\text{m}$ )	1.50 $\pm$ 0.13	0.80 $\pm$ 0.08	0.008
BCF (Hz)	15.38 $\pm$ 0.86	15.82 $\pm$ 0.84	0.752
STR (%)	67.44 $\pm$ 3.40	86.75 $\pm$ 2.80	0.012
LIN (%)	50.16 $\pm$ 4.07	77.64 $\pm$ 5.25	0.007
WOBBLE (%)	68.92 $\pm$ 2.62	82.64 $\pm$ 1.57	<0.001
RAPID (%)	22.80 $\pm$ 2.71	8.54 $\pm$ 1.63	0.003
MEDIUM (%)	37.34 $\pm$ 3.32	19.19 $\pm$ 2.70	0.001
SLOW (%)	31.51 $\pm$ 1.55	40.64 $\pm$ 4.91	0.099
STATIC (%)	<b>8.33 <math>\pm</math> 2.04</b>	<b>31.61 <math>\pm</math> 3.86</b>	<b>0.006</b>

3 Abbreviations: ALH, lateral head amplitude; BCF, beat cross frequency; LIN, linearity; PM, progressive  
 4 motility; RAPID, fast sperm velocity; MEDIUM, medium sperm velocity; SLOW, slow sperm velocity;  
 5 STATIC, static sperm; STR, straightness; TM, total motility; VAP, average path velocity; VCL,  
 6 curvilinear velocity; VSL, straight line velocity; WOBBLE,  $([\text{VAP}/\text{VCL}] \times 100)$

7

8

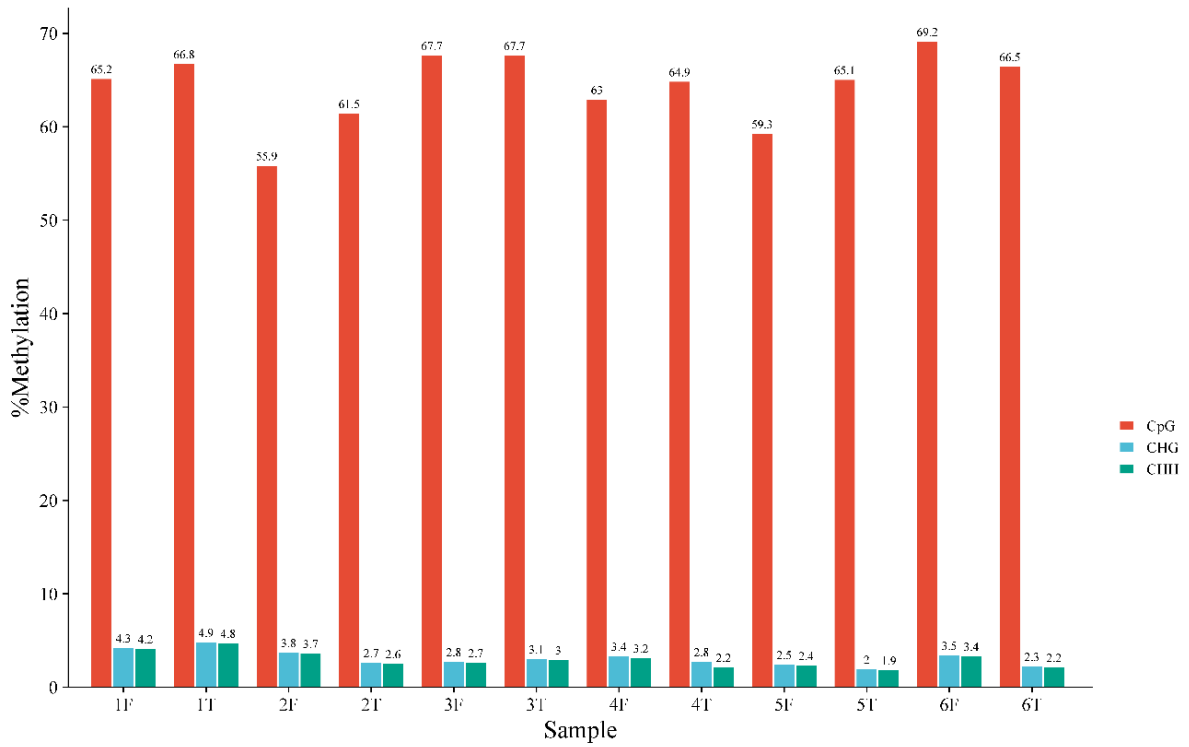
1 **Table 2** Summary of the sequencing data obtained in the RRBS analysis. Total trimmed reads. The %  
 2 mapping efficiency = (number of reads that mapped only once on the genome/trimmed reads number)  
 3  $\times 100$ . The % total genomic cytosines in CpG, CHG and CHH sites refers to (number of identified  
 4 cytosines in CpG sites/number of cytosines in CpG sites in the reference genome) $\times 100$ . Values are  
 5 expressed in each condition (Fresh (F) and Thawed (T))

Sample	Total trimmed reads $\times 10^6$	% Mapping Efficiency	%C Methylated in CpG Context	%C Methylated in CHG Context	%C Methylated in CHH Context
1F	45.31	20.0	65.2	4.3	4.2
2F	46.15	20.3	55.9	3.8	3.7
3F	45.20	21.4	67.7	2.8	2.7
4F	39.47	20.4	63.0	3.4	3.2
5F	47.63	21.1	59.3	2.5	2.4
6F	41.82	19.9	69.2	3.5	3.4
1T	37.38	23.1	66.8	4.9	4.8
2T	38.07	22.5	61.5	2.7	2.6
3T	47.61	20.5	67.7	3.1	3.0
4T	42.54	21.7	64.9	2.8	2.2
5T	35.87	19.8	65.1	2.0	1.9
6T	26.45	20.0	66.5	2.3	2.2

6

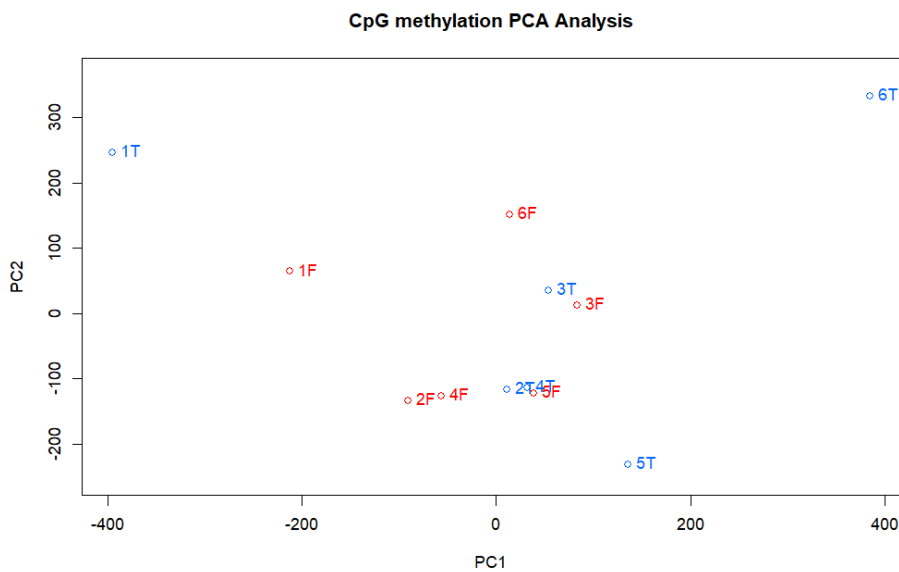
7

1



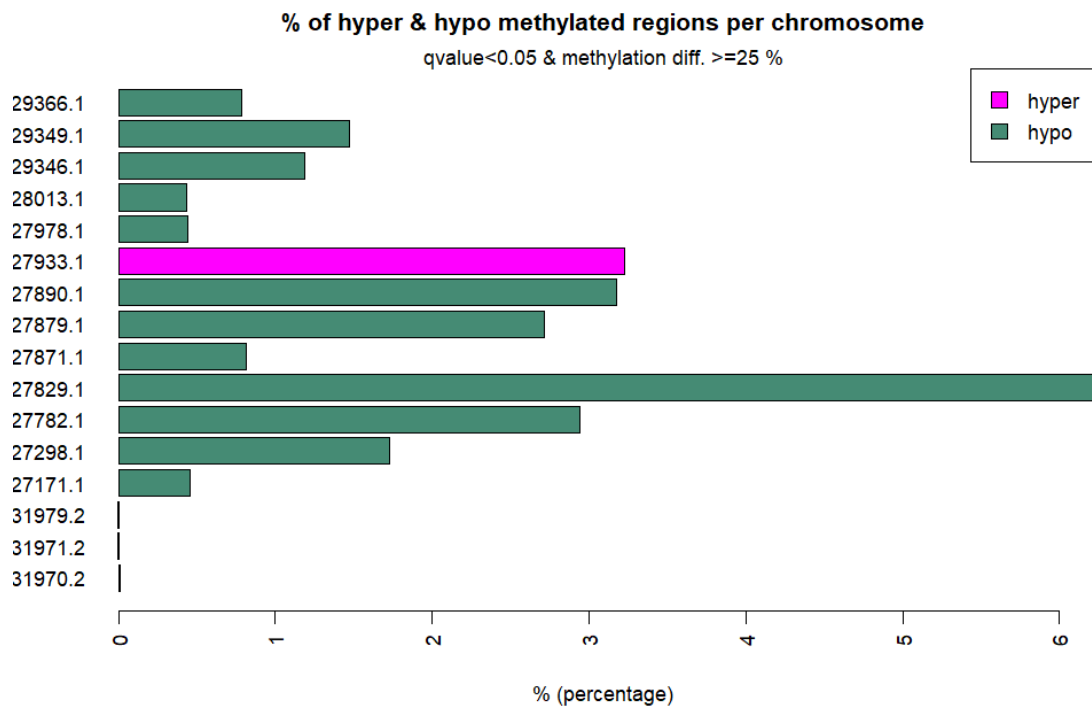
2

3 **Figure 2** Histogram showing the distribution of the number of paired cytosines according to each male,  
 4 comparison between fresh and cryopreservation. Results are expressed as a percentage of the total  
 5 number of paired cytosines



6

7 **Figure 3** Principal Component Analysis showing the distribution of the fresh and cryopreserved sperm  
 8 samples according to the DNA methylation ratio of each cytosine within each individual sample (n = 6  
 9 sperm samples per condition).



1

2 **Figure 4** Potentially sensitive regions after cryopreservation

3

## 1 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

2 Considerando a escassez de estudos na literatura que investigam a  
3 aplicabilidade da proAKAP4 em amostras de felinos domésticos, assim como,  
4 alterações no perfil de metilação do DNA em espermatozoides de tilápia do Nilo, os  
5 estudos descritos surgem como novos métodos para aprimorar a pesquisa em relação  
6 a competência espermática pós-criopreservação.

7 O impacto do sêmen na fertilidade continua sendo um tema de  
8 interesse, e é essencial conduzir pesquisas para aprofundar o entendimento das  
9 limitações ainda presentes na reprodução.

10 No primeiro capítulo, foram identificadas relações entre a  
11 concentração da proAKAP4 e os parâmetros de cinética em espermatozoides  
12 ejaculados e epididimários pós descongelação. Com isso, foi possível elucidar a  
13 eficácia da proAKAP4 como biomarcador da motilidade espermática na espécie felina.  
14 Esses achados abrem caminhos para novos estudos que possam agregar e/ou  
15 reforçar a eficácia do marcador protéico e assim futuramente poder utilizá-lo como  
16 ferramenta na seleção de machos férteis para as biotecnologias reprodutivas.

17 No segundo capítulo, a avaliação da metilação do DNA em  
18 espermatozoides de tilápia do Nilo revelou mudanças significativas no perfil do DNA  
19 pós criopreservação. Essas alterações podem afetar genes específicos, e que  
20 dependendo da região cromossômica afetada, podem interferir no processo de  
21 fecundação e, possivelmente, no desenvolvimento embrionário. Portanto, explorar  
22 ainda mais a metilação do DNA em escala genética em espermatozoides de peixes  
23 será uma questão importante nas biotecnologias reprodutivas para garantir a  
24 segurança das características epigenéticas da prole.

25

26

27

28

29

30

31

32

33

## 1 8 DESAFIOS

2

3

4

5

6

Realizar um trabalho científico é sempre um desafio. Ainda mais quando alcançamos o doutorado, que buscamos o mais complexo, o inédito e a excelência. No entanto, todo o pós-graduando vivencia a lei de Murphy, em algum momento da pesquisa. É claro que eu não seria a exceção.

7

8

9

10

11

12

13

14

15

No meu período de doutorado, os desafios iniciaram-se logo no ano de ingresso (2020). De acordo com o cronograma a 1° etapa do estudo deveria ter sido realizada no segundo semestre de 2020 (primavera) e primeiros meses de 2021 (verão). Contudo, devido a pandemia, as orientações foram: regime de quarentena e isolamento social por tempo indeterminado, prejudicando assim, o início do projeto. Desta forma, ficamos no aguardo das próximas orientações para que pudéssemos dar início ao projeto, sendo possível iniciar apenas no mês de outubro de 2021. A escolha do período foi pelo fator sazonalidade, em que os animais apresentam melhor qualidade espermática no período de primavera/verão.

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

Além da pandemia que dificultou o início das atividades, outro fator que precisa ser citado é a questão do comprometimento do tutor com o estudo. Infelizmente, em condições de pesquisa, nosso público-alvo foi tutores de animais que buscavam castrações eletivas a custo reduzido, dependíamos do empenho e responsabilidade do tutor com o estudo. Eram agendados 6 a 7 animais por semana, no entanto, alguns tutores confirmavam a inclusão do animal no projeto, mas não compareciam no dia. Além disso, por muitas vezes, mesmo sendo esclarecidos sobre a idade mínima de inclusão do animal na pesquisa (12 meses, por causa da maturidade sexual), traziam animais filhotes, prejudicando o N de animais. Outra questão que também dificultava o desenvolvimento do estudo era o temperamento dos animais, que as vezes impossibilitava o manejo.

27

28

29

30

31

32

Apesar das dificuldades, logo no início da 1° etapa, observamos nos primeiros animais submetidos à colheita espermática por cateterização uretral que, quando a colheita farmacológica era realizada após 15 minutos, o volume do ejaculado recuperado era maior e apresentava melhor qualidade em comparação com o tempo de 10 minutos. Essas descobertas nos permitiram publicar um dos artigos do primeiro capítulo.

33

34

No ano de 2023, tive a oportunidade de participar do programa de internacionalização na Nord University, Noruega. Essa experiência foi um desafio

1 muito grande, porque era uma espécie no qual eu nunca tinha trabalhado e além disso,  
2 com epigenética. Tudo foi muito intenso e desafiador. Apesar de todas as dificuldades  
3 enfrentadas e superadas durante o desenvolvimento do estudo (aprimoramento dos  
4 protocolos de criopreservação, extração do DNA, preparação de bibliotecas e até o  
5 presente momento a análise da Metilação do DNA), isso tudo, me trouxe força, me fez  
6 crescer e acreditar mais em mim e no meu potencial como aluna. E eu sou muito  
7 grata por tudo.

8                   Ainda assim, com tantas dificuldades, foi possível realizar um  
9 experimento inédito, com força de vontade e apoio de todos os envolvidos.  
10 Certamente novas descobertas ainda serão realizadas neste campo de estudo,  
11 incluindo novas espécies, com o intuito de reforçar a importância das análises  
12 biomoleculares como biomarcadores da qualidade espermática.