

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

Avaliação física e morfofuncional de sêmen de caprinos pré e pós liofilização

Natan Dias de Oliveira
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

NATAN DIAS DE OLIVEIRA

Avaliação física e morfofuncional de sêmen de caprinos pré e pós liofilização

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Jose Domingos Guimaraes

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

Oliveira, Natan Dias de, 1999-
O48c Avaliação física e morfo-funcional de sêmen de caprinos
2025 pré e pós liofilização / Natan Dias de Oliveira. – Viçosa, MG,
2025.

1 dissertação eletrônica (76 f.): il. (algumas color.).

Orientador: José Domingos Guimarães.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Veterinária, 2025.

Referências bibliográficas: f. 55-76.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.379>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Caprinos - Reprodução. 2. Espermatozóides - Avaliação.
3. Liofilização. I. Guimarães, José Domingos, 1963-
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 636.39082

NATAN DIAS DE OLIVEIRA

Avaliação física e morfofuncional de sêmen de caprinos pré e pós liofilização

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 27 de fevereiro de 2025.

Assentimento:

Natan Dias de Oliveira
Autor

Jose Domingos Guimaraes
Orientador

Essa dissertação foi assinada digitalmente pelo autor em 30/07/2025 às 09:56:57 e pelo orientador em 21/08/2025 às 14:36:32. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **J3KB.ECQ6.H526** e clique no botão 'Validar documento'.

A Deus, à minha família, aos meus mestres, aos amigos,
e a todas as pessoas que contribuíram para que
esta conquista se tornasse realidade
serei sempre imensamente grato.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meus passos, me conduzir com sabedoria e cercar minha vida de pessoas boas ao longo da jornada.

Aos meus pais, Guilherme e Luzethe, e aos meus irmãos, Leandro e Guilherme, pelo apoio incondicional e por sempre me priorizarem, mesmo nos momentos mais difíceis. Obrigado sobretudo por me ajudarem a me tornar o homem que sou hoje. Ao meu orientador, José Domingos Guimarães, pela oportunidade, pela paciência, e pela amizade. Minha sincera gratidão por sua confiança em mim. A ele, minha eterna admiração.

A todos os meus amigos e colegas que me acompanharam ao longo desta jornada, meu sincero agradecimento pelo apoio e por compartilharem comigo a alegria de cada conquista. Aos amigos de Viçosa, em especial, agradeço por me acolherem tão bem. Vocês tornaram essa caminhada mais leve e o trabalho muito mais agradável.

À Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Caprinos e Ovinos, e a toda a sua equipe, agradeço pela valiosa parceria e pelo suporte prestado durante a realização deste estudo.

À Botupharma Ltda., pelo fornecimento dos diluentes utilizados nos protocolos de congelamento seminal.

Ao Programa de Apoio à Pós Graduação – PAPG (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos responsáveis pela secretaria da Pós-Graduação, Rosi e, mais recentemente, Aparecido, meu agradecimento pela constante disponibilidade e atenção, sempre dispostos a ajudar com cordialidade.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Medicina Veterinária e ao Programa de Pós Graduação, pela oportunidade de seguir crescendo em níveis pessoal e profissional.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

A cada gesto de apoio, escuta e compreensão ao longo desta jornada, meu muito obrigado, de coração.

“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia após dia”.
(Robert Collier)

RESUMO

OLIVEIRA, Natan Dias de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2025. **Avaliação física e morfofuncional de sêmen de caprinos pré e pós liofilização.** Orientador: Jose Domingos Guimaraes.

A preservação eficiente de gametas masculinos representa um pilar estratégico das biotecnologias reprodutivas voltadas à conservação genética e ao melhoramento animal. Embora a criopreservação seja amplamente utilizada, suas limitações operacionais e ambientais têm estimulado a investigação de métodos alternativos, como a liofilização. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da liofilização sobre a morfologia, a viabilidade celular e a integridade funcional da membrana plasmática de espermatozoides caprinos (*Capra aegagrus hircus*). Foram utilizados ejaculados de seis reprodutores adultos, clinicamente saudáveis, coletados por vagina artificial e avaliados conforme critérios do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). As amostras com motilidade $\geq 70\%$ e vigor ≥ 3 foram diluídas com meio comercial BotuBov® e divididas em três grupos experimentais: controle (sem trealose), adição de 0,2 M de trealose e adição de 0,5 M de trealose. Após resfriamento a 5°C , as amostras foram congeladas até -100°C , liofilizadas a -55°C sob vácuo por 24 horas e, em seguida, reidratadas com água ultrapura. Foram então avaliadas quanto à morfologia (microscopia de contraste de fase), viabilidade celular (eosina-nigrosina) e integridade funcional de membrana (HOST). Verificou-se perda total da motilidade e do vigor espermático em todos os grupos liofilizados. A comparação entre liofilização e criopreservação não revelou diferenças estatísticas nos parâmetros de viabilidade celular, integridade funcional de membrana, defeitos maiores ou totais. Apenas motilidade e vigor diferiram, sendo nulos na liofilização. Em relação aos defeitos menores (DEFMEN), não houve diferença estatística entre nenhum grupo tratado (liofilizado ou criopreservado) e o sêmen fresco, indicando preservação desse parâmetro mesmo após os procedimentos de conservação. Tais achados indicam que, embora a liofilização comprometa severamente a cinética espermática, ela é capaz de manter, em níveis comparáveis à criopreservação, características estruturais importantes, como viabilidade celular, integridade de membrana e morfologia fina. Considerando que a motilidade não é requisito essencial para técnicas como a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), a liofilização, quando bem conduzida, pode representar uma alternativa viável à criopreservação tradicional em programas de conservação genética e reprodução assistida, sobretudo para pequenos ruminantes.

Palavras-chave: Parâmetros espermáticos; Preservação gamética; Integridade celular; Biotecnologia da reprodução; Injeção intracitoplasmática de espermatozoides.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Natan Dias de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2025. **Morpho functional and physical evaluation of goat semen before and after lyophilization.** Adviser: Jose Domingos Guimaraes.

The efficient preservation of male gametes represents a strategic pillar of reproductive biotechnologies aimed at genetic conservation and animal breeding. Although cryopreservation is widely used, its operational and environmental limitations have stimulated the investigation of alternative methods, such as lyophilization. This study aimed to evaluate the effects of lyophilization on the morphology, cell viability, and functional integrity of the plasma membrane of goat spermatozoa (*Capra aegagrus hircus*). Ejaculates were collected from six healthy adult bucks using artificial vagina and evaluated according to the standards of the Brazilian College of Animal Reproduction (CBRA, 2013). Samples showing progressive motility $\geq 70\%$ and vigor ≥ 3 were diluted in BotuBov® commercial extender and distributed into three experimental groups: control (without trehalose), addition of 0.2 M trehalose, and addition of 0.5 M trehalose. Samples were cooled to 5°C , frozen in a programmed curve to -100°C , and lyophilized at -55°C under vacuum for 24 hours. After rehydration with ultrapure water, sperm cells were evaluated for morphology (phase-contrast microscopy), cell viability (eosin-nigrosin stain), and plasma membrane functional integrity (hypoosmotic swelling test – HOST). A total loss of sperm motility and vigor was observed in all lyophilized groups. The comparison between lyophilized and cryopreserved semen revealed no statistical differences in cell viability, membrane integrity, or in the incidence of major and total morphological defects. Only motility and vigor differed significantly, with complete loss observed in lyophilized samples. Regarding minor defects, no statistical difference was found between any treated group (lyophilized or cryopreserved) and fresh semen, indicating preservation of this parameter even after conservation procedures. These findings indicate that although lyophilization severely compromises sperm kinetics, it can preserve structural characteristics such as cell viability, membrane integrity, and fine morphology at levels comparable to cryopreservation. Considering that motility is not essential for techniques such as intracytoplasmic sperm injection (ICSI), lyophilization, when properly conducted, may represent a viable alternative to conventional cryopreservation in genetic conservation programs and assisted reproduction strategies, especially for small ruminants.

Keywords: Sperm parameters; Gamete preservation; Cell integrity; Reproductive biotechnology; Intracytoplasmic sperm injection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Valores médios do volume do ejaculado fresco de bodes ($n = 6$), coletados durante o período experimental.

Figura 2 – Matriz de correlação de Pearson entre os parâmetros seminais à fresco. A análise demonstra as associações lineares entre volume do ejaculado, turbilhonamento, motilidade espermática, vigor espermático e concentração espermática.

Figura 3 – Variações nos parâmetros seminais à fresco entre coletas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fragmentação do DNA espermático em diferentes espécies animais de produção, de acordo com o meio de preservação (MEIO), temperatura de armazenamento (ARMAZ. (°C), método de análise (TESTE) e percentual de fragmentação observado (F.%).

Tabela 2 – Condições experimentais aplicadas à liofilização de sêmen em diferentes espécies de animais, incluindo os valores de pressão (mBar) e tempo (h) de exposição durante a fase de desidratação a vácuo, conforme descrito por diferentes autores.

Tabela 3 – Liofilização espermática de diferentes espécies, de acordo a cronologia do evento e produtos obtidos.

Tabela 4 – Valores médios, desvio padrão e amplitude dos parâmetros analisados para o sêmen fresco.

Tabela 5 – Volume do ejaculado de bodes classificados por grupo etário.

Tabela 6 – Dados das diferentes variáveis submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Duncan e Dunnett (>5%).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Estrutura e função dos espermatozoides caprinos.....	16
2.2 Função dos Espermatozoides	18
2.3 Interação espermatozoide/oócito e reação acrossômica.....	18
2.4 Parâmetros de qualidade espermática e sua relação com a fertilidade de caprinos.....	19
2.4.1 Motilidade e vigor espermático	20
2.4.2 Volume do ejaculado e concentração espermática.....	21
2.4.3 Morfologia espermática.....	22
2.4.4 Integridade de membranas e viabilidade celular	23
2.5 Técnicas de preservação seminal, fundamentos da técnica e importância na reprodução assistida	23
2.5.1 Criopreservação.....	24
2.5.1.1 Princípios biológicos da criopreservação	24
2.5.1.2 Aplicações na reprodução animal	24
2.5.1.3 Etapas do processo de criopreservação seminal.....	24
2.5.1.4 Impacto da criopreservação na qualidade espermática.....	25
2.5.2 Fatores críticos na criobiologia espermática	25
2.5.3 Liofilização seminal: fundamentos, mecanismos de desidratação e desafios	27
2.5.3.1 Mecanismos de adaptação à desidratação	28
2.5.3.2 Princípios e mecanismos da liofilização.....	28
2.5.3.3 Etapas do processo de liofilização.....	29
2.5.3.4 Riscos e desafios da liofilização espermática.....	29
2.5.3.5 Eventos químicos e físicos da liofilização.....	29
2.5.3.6 Impacto da liofilização na integridade cromossômica dos espermatozoides	30
2.5.3.7 Diferentes parâmetros da liofilização e impacto na viabilidade espermática.....	32
2.5.3.8 Condições de armazenamento do sêmen liofilizado	34
2.6 Excipientes	34
2.6.1 Toxicidade dos excipientes	35
2.6.2 Trealose	35

2.7 Histórico, perspectivas futuras e aplicações biotecnológicas	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 Local e animais experimentais	38
3.2 Coleta e avaliação seminal	39
3.3 Avaliação de motilidade e vigor espermático	39
3.4 Diluição e resfriamento seminal.....	40
3.5 Avaliação de concentração espermática.....	40
3.6 Avaliação de morfologia espermática	41
3.7 Congelamento seminal	41
3.8 Liofilização seminal	42
3.9 Reidratação das amostras	42
3.10 Avaliação das amostras pós-preservação	43
3.11 Teste hiposmótico	43
3.12 Teste supravital	44
3.11 Análises estatística	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Sêmen fresco	45
4.2 Sêmen fresco, liofilizado e criopreservado	52
5. CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1 Introdução

A qualidade do material biológico armazenado é diretamente influenciada pelo método de conservação empregado, tornando essencial a escolha da abordagem mais apropriada para os objetivos da pesquisa (LOVE et al., 2018). Estratégias de armazenamento vêm sendo continuamente aprimoradas para otimizar a viabilidade e a integridade das amostras, ao mesmo tempo em que visam minimizar desafios logísticos e impactos ambientais (CAENAZZO et al., 2020).

A criopreservação é a técnica mais difundida para conservação de biomateriais, baseada no armazenamento a temperaturas ultrabaixas (-20, -80 ou -196 °C) em ultrafreezers ou tanques de nitrogênio líquido. Embora altamente eficaz na preservação da viabilidade celular, essa metodologia impõe desafios logísticos e financeiros, como elevado consumo energético, necessidade de infraestrutura específica e altos custos operacionais, como manutenção contínua e gestão segura da cadeia de frio (MULLER et al., 2016). Adicionalmente, os impactos ambientais, como a liberação de calor e o uso de fluídos refrigerantes, fomentam a busca por alternativas mais sustentáveis.

A conservação de amostras biológicas em temperatura ambiente surge como uma alternativa economicamente viável e operacionalmente simplificada. Técnicas de estabilização molecular possibilitam a manutenção de biomateriais sem necessidade de refrigeração, reduzindo custos logísticos e estruturais (LOU et al., 2014; MULLER et al., 2016). Contudo, a aplicação desse método a células, como os espermatozoides, ainda enfrenta desafios técnicos, especialmente na preservação da viabilidade funcional e da integridade estrutural após a reconstituição.

A liofilização tem sido amplamente investigada como uma alternativa promissora à criopreservação convencional no contexto das biotecnologias reprodutivas. Entre as abordagens baseadas na desidratação espermática, Saragusty e Loi (2019) identificaram 138 publicações sobre secagem de espermatozoides e outras células, sendo 99 (71,7%) utilizaram a liofilização, evidenciando sua predominância em relação a outras metodologias, que permanecem pouco exploradas. Essa técnica, fundamentada na remoção da água celular por sublimação sob vácuo em temperaturas reduzidas, apresenta vantagens significativas, incluindo maior biossegurança e estabilidade prolongada durante o armazenamento e transporte, aspectos cruciais à viabilidade de gametas e

células reprodutivas em longo prazo (KUSAKABE et al., 2001; BIELANSKI et al., 2003; KANEKO e NAKAGATA, 2006; HOCHI et al., 2011; KARTOGLU, MOORE e LLOYD, 2020).

Apesar dos avanços na otimização dos protocolos de liofilização para espermatozoides, há lacunas no entendimento dos efeitos morfofuncionais desse processo em espécies de interesse zootécnico, como os caprinos. Estudos sobre a funcionalidade espermática pós-liofilização nesta espécie ainda são escassos, sendo que a maioria das pesquisas se concentram em modelos murinos e humanos (GIANAROLI et al., 2012; CABRAL, 2017; ITO et al., 2021; SHAHMORADI, BAHEIRAEI e HALVAEI, 2022).

Além disso, os estudos publicados até o momento focam principalmente na estabilidade da cromatina e na integridade do DNA, dado que a principal aplicação dessa técnica tem sido a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), já implementada em espécies domésticas como equinos (RAMÍREZ-AGÁMEZ et al., 2023; NAMBO et al., 2024; SAMPER et al., 2024), bovinos (UNNIKRISHNAN, KASTELIC e THUNDATHIL, 2021; KAGAWA et al., 2022), pequenos ruminantes (KRESNA et al., 2021; RESSAISSI et al., 2021; ELORIAGA et al., 2024) e suínos (BRISKI et al., 2021; NAKAI et al., 2024), entre outras espécies.

Os métodos convencionais de análise seminal incluem avaliação da concentração, morfologia e motilidade espermática, conforme diretrizes do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). No entanto, esses parâmetros isolados não fornecem uma estimativa precisa do potencial fertilizante dos espermatozoides (WANG e SWERDLOFF, 2014). Atualmente, não há consenso sobre os testes mínimos necessários para avaliar a qualidade espermática após liofilização, e a literatura ainda carece de protocolos padronizados que considerem múltiplos marcadores além da integridade do DNA (MARTINS et al., 2007; GIANAROLI et al., 2012; OLACIREGUI et al., 2015; SAID, AFIATI e MAULANA, 2015; KAZORGAH et al., 2023). Ademais, informações sobre a aplicação da liofilização em espécies de interesse pecuário ainda são limitadas.

A caracterização física e morfofuncional do sêmen liofilizado é fundamental para compreender os efeitos desse processo sobre a viabilidade e o potencial fecundante dos espermatozoides. Alterações ultraestruturais e funcionais podem comprometer tanto a

fertilização *in vitro* quanto a aplicação da tecnologia de ICSI. Assim, o desenvolvimento de estratégias que minimizem danos celulares e assegurem a integridade do material genético é essencial para viabilizar a liofilização como ferramenta para conservação do germoplasma em animais de produção.

Além de contribuir para o avanço do conhecimento sobre a viabilidade espermática pós-liofilização, este estudo pode fornecer subsídios para o desenvolvimento de novas estratégias de preservação seminal, favorecendo a aplicação da biotecnologia reprodutiva em programas de conservação genética e melhoramento animal. Diante desse contexto, este estudo objetiva avaliar os impactos da liofilização na integridade estrutural e funcional dos espermatozoides caprinos. Para isso, serão analisados parâmetros físicos, morfológicos e funcionais, incluindo marcadores de membrana e nanopartículas fluorescentes, antes e após o processo de liofilização.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Estrutura e função dos espermatozoides caprinos

A arquitetura espermática é composta por três compartimentos principais: cabeça, peça intermediária e cauda. A cabeça, de formato elíptico, abriga o núcleo altamente compactado e envolto pelo acrossoma, estrutura essencial para a interação e penetração na zona pelúcida do oócito. A peça intermediária contém um arranjo mitocondrial em hélice, que fornece energia para a movimentação flagelar, enquanto a cauda, composta pelo axonema e estruturas associadas, garante a propulsão espermática necessária para a progressão nos órgãos reprodutivos femininos (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

A funcionalidade espermática é regulada por um complexo equilíbrio bioquímico, que influencia a fluidez da membrana plasmática, a atividade mitocondrial, a resposta à sinais moleculares durante a capacitação espermática e a reação acrossômica. Alterações morfofuncionais nesses processos podem comprometer a fertilização e a eficiência reprodutiva (MOSTEK et al., 2021; KELLER e KERNS, 2023) Assim, a caracterização detalhada da estrutura e função dos espermatozoides é fundamental para o aprimoramento de biotecnologias reprodutivas e para a maximização das taxas de fertilidade em programas de reprodução assistida.

A cabeça do espermatozoide de caprinos apresenta morfologia predominantemente oval ou elíptica e é constituída, em sua maior parte, pelo núcleo, que armazena o DNA paterno altamente condensado. A compactação do material genético resulta da substituição das histonas por protaminas, conferindo maior estabilidade estrutural ao DNA e protegendo-o contra danos durante o trânsito pelos órgãos reprodutivos feminino (MILLER, BRINKWORTH e ILES, 2010).

Além do núcleo, a cabeça espermática abriga o acrossoma, organela derivada do complexo de Golgi que recobre sua região anterior. O acrossoma desempenha um papel essencial no processo de fertilização, uma vez que contém enzimas hidrolíticas necessárias para a digestão da matriz extracelular do oócito, permitindo a passagem do espermatozoide pela zona pelúcida e a subsequente fusão dos pró-núcleos masculino e feminino (TOSHIMORI e EDDY, 2015).

A cauda do espermatozoide é dividida em três regiões principais: peça intermediária (MP), peça principal (PP) e peça terminal, cada uma caracterizada por componentes estruturais específicas. A peça intermediária desempenha papel crucial na motilidade espermática, atuando como a região de transição entre a cabeça e a cauda. Nessa região, mitocôndrias organizadas em hélice ao redor do axonema são responsáveis pela síntese de adenosina trifosfato (ATP), fornecendo a energia necessária para a movimentação espermática (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

A eficiência bioenergética da peça intermediária influencia diretamente a capacidade do espermatozoide de alcançar o oócito e participar da fecundação, sendo, portanto, um fator determinante no sucesso reprodutivo (TEVES e ROLDAN, 2022). Além disso, essa estrutura contém a bainha mitocondrial e as fibras densas externas (FDEx), que conferem suporte estrutural e elasticidade ao flagelo (LEHTI e SIRONEN, 2017).

A peça principal abriga a bainha fibrosa (BF), composta por duas colunas longitudinais ancoradas aos dupletos 3 e 8 do axonema, as quais promovem o deslocamento parcial das FDEx e são interligadas por nervuras semicirculares. Essa bainha apresenta uma composição proteica estabilizada por ligações dissulfeto, sendo essencial para a manutenção da integridade estrutural e flexibilidade do espermatozoide

durante sua progressão pelos órgãos reprodutivos feminino (EDDY, TOSHIMORI e O'BRIEN, 2003). Adicionalmente, a BF contém enzimas glicolíticas e moléculas sinalizadoras que regulam processos bioquímicos fundamentais à motilidade e funcionalidade espermática (EDDY, 2007; LEHTI e SIRONEN, 2017).

Por fim, a peça terminal compreende exclusivamente o axonema, sendo desprovida de estruturas peri-axonêmicas. Essa região representa a porção final do flagelo e está diretamente envolvida na transmissão do movimento gerado pelas regiões proximais, contribuindo para a propulsão do espermatozoide.

2.2 Função dos Espermatozoides

A função primordial dos espermatozoides é viabilizar a fecundação, processo que requer a integridade de três características fundamentais: motilidade espermática progressiva, manutenção das propriedades físicas e funcionais da membrana plasmática e competência para fusão com a zona pelúcida e formação do pró-núcleo masculino. Esses atributos são essenciais para a viabilidade espermática e o sucesso reprodutivo, refletindo diretamente na capacidade fecundante das células germinativas masculinas.

2.3 Interação espermatozoide/oócito e reação acrossômica

A fertilização em mamíferos é um processo altamente espécie-específico, dependente de interações moleculares entre espermatozoide e zona pelúcida (ZP) do oócito. A adesão inicial do espermatozoide à ZP, referida como ligação primária, ocorre por meio de interações específicas entre moléculas complementares presentes na superfície do gameta masculino e na matriz glicoprotéica do oócito, sendo um evento determinante para a fertilização bem-sucedida (TUMOVA et al., 2021).

A aquisição da competência espermática para interagir com a ZP ocorre por meio de modificações pós-testiculares na membrana plasmática, que se iniciam durante a maturação epididimária e culminam na capacitação espermática nos órgãos reprodutivos femininos. Avanços recentes indicam que a capacitação é um processo multifásico que envolve alterações bioquímicas e funcionais do espermatozoide, moduladas também por estruturas extracelulares do oócito. Essas mudanças incluem aprimoramento da motilidade, quimiotaxia, reconhecimento e adesão à ZP, reação acrossômica e fusão das

membranas plasmáticas dos gametas (FLESCH e GADELLA, 2000; CLARK, 2014; GADELLA e BOERKE, 2016; TOSTI e MÉNÉZO, 2016).

Durante a interação com a ZP, os espermatozoides capacitados sofrem a reação acrossômica (RA), um evento excitatório altamente regulado e dependente de Ca^{2+} . A indução da RA ocorre em resposta à ligação secundária do espermatozoide à ZP, promovendo rápido aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} e a exocitose do conteúdo acrossomal (JUNGNICKEL et al., 2007; FLORMAN, JUNGNICKEL e SUTTON, 2008). Esse processo resulta na liberação de enzimas hidrolíticas, como a acrosina, que facilitam a penetração do espermatozoide através da ZP, além de promover a remodelação da membrana plasmática espermática, permitindo sua fusão com o oócito (INOUE et al., 2011; JIN et al., 2011; BIANCHI e WRIGHT, 2016; ALDANA et al., 2021).

Após a penetração espermática, o oócito completa a segunda divisão meiótica, culminando na extrusão do segundo corpúsculo polar e no início do primeiro ciclo mitótico do embrião recém-formado. Paralelamente, a ativação do espermatozoide induzida pelo oócito desencadeia um processo de ativação recíproca, caracterizado por modificações elétricas, estruturais e metabólicas no oócito, eventos fundamentais para o sucesso da fertilização e para a progressão do desenvolvimento embrionário (TOSTI e MÉNÉZO, 2016).

A redução das ligações dissulfeto das protaminas espermáticas, associada à ruptura do envelope nuclear, favorece a descondensação da cromatina do espermatozoide. Nesse processo, as protaminas são gradualmente substituídas por histonas oriundas do citoplasma oocitário. Como resultado, forma-se um zigoto totipotente caracterizado pela presença de dois pronúcleos haploides, cuja cromatina se descondensa progressivamente. No interior de ambos os pronúcleos, encontram-se corpos precursores nucleolares (NPBs), que representam a forma imatura dos nucléolos (ZATSEPINA et al., 2003).

2.4 Parâmetros de qualidade espermática e sua relação com a fertilidade de caprinos

A qualidade espermática constitui um determinante da fertilidade em caprinos e influencia diretamente a eficiência das biotecnologias reprodutivas, incluindo a

inseminação artificial (IA) e a fertilização *in vitro* (FIV). A avaliação do sêmen baseia-se na análise de parâmetros essenciais, tais como motilidade espermática progressiva, vigor espermático, concentração espermática, morfologia espermática e integridade das membranas plasmática e acrossomal, os quais são amplamente utilizados como preditores do potencial fecundante dos espermatozoides ou preditores de fertilidade dos reprodutores.

2.4.1 Motilidade e vigor espermático

A motilidade espermática é amplamente reconhecida como um dos principais preditores de qualidade seminal e fertilidade, refletindo diretamente a competência funcional dos espermatozoides (GRAHAM e MOCÉ, 2005; PAOLI et al., 2011). Essa propriedade é definida pela propagação de ondas transversais ao longo do flagelo em uma direção proximal-distal, gerando impulso propulsivo que permite a progressão dos espermatozoides pelos órgãos reprodutivos femininos e sua interação com as membranas ovocitárias.

A capacidade de transitar eficientemente pelo ambiente reprodutivo feminino — da vagina ao oviduto — é determinante para o sucesso da fertilização (SUAREZ e PACEY, 2006). A redução da motilidade espermática está diretamente associada à diminuição do potencial fertilizante do sêmen, uma vez que espermatozoides menos móveis apresentam menor capacidade de alcançar e fecundar o ovócito (GUZICK et al., 2001; LOVE, 2011; PUGLISI et al., 2012; YÁNIZ et al., 2018). No entanto, evidências indicam que essa relação é significativa apenas até um determinado limiar, além do qual incrementos adicionais não resultam em melhorias expressivas na fertilidade (DEN DASS et al., 1992).

Den Dass et al. (1998) ainda relataram que o número absoluto de espermatozoides móveis apresenta baixa correlação com o “Não Retorno Assintótico” (NRA), sugerindo que a motilidade espermática isoladamente pode não ser um indicador confiável do potencial fertilizante, reforçando a natureza multifatorial da fertilidade, que envolve também capacitação, reação acrossômica e integridade das membranas.

De acordo com o CBRA (2013) recomenda-se motilidade espermática progressiva $\geq 70\%$ para sêmen fresco e $\geq 30\%$ para sêmen pós-descongelado destinado à inseminação

artificial em rebanhos. O vigor espermático, por sua vez, representa a intensidade do deslocamento progressivo, avaliado subjetivamente em escala de 0 a 5. Essa característica reflete a velocidade com que os gametas atravessam o campo óptico e complementa a avaliação da motilidade (MAIA, 2010).

A cinética espermática também pode ser determinada por sistemas automatizados como o CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis), que classificam os padrões de movimento em diferentes categorias, aumentando a acurácia da análise (MORTIMER e MAXWELL, 1999; AMANN e KATZ, 2004). Segundo o CBRA (2013), os valores mínimos de vigor espermático recomendados são ≥ 3 para sêmen fresco e ≥ 2 para sêmen congelado/descongelado. A análise combinada de motilidade e vigor permite uma caracterização mais precisa do potencial fecundante dos espermatozoides.

2.4.2 Volume do ejaculado e concentração espermática

O volume do ejaculado e a concentração espermática por mL ou do ejaculado são influenciados por fatores intrínsecos e extrínsecos, incluindo a anatomia testicular (volume testicular e reserva gonádica), idade, frequência de coletas ou ejaculações, condição nutricional e condições ambientais (KUMAR, SINGH e CHOUDHARI, 2017; SINGH et al., 2018; HOANG-THI et al., 2022; MONTES-GARRIDO et al., 2023).

De maneira geral, pequenos ruminantes, como caprinos e ovinos, apresentam volume do ejaculado relativamente reduzido (0,5 – 1,5 mL), mas com alta concentração espermática. Nos caprinos, essa característica está associada à sua estratégia reprodutiva, e a produção espermática pode variar amplamente, com total de 1,0 a 7,2 bilhões de espermatozoides por ejaculado (MAIA, 2010).

A concentração espermática é um parâmetro essencial na avaliação da qualidade seminal e impacta diretamente a eficiência das biotecnologias reprodutivas. Na inseminação artificial, a padronização da dose inseminante é fundamental para otimizar as taxas de fertilização. O CBRA (2013) recomenda o mínimo de 10×10^6 espermatozoides móveis por dose pós descongelamento para doses produzidas pelas empresas brasileiras e 6×10^6 para doses produzidas pelas empresas estrangeiras.

2.4.3 Morfologia espermática

A análise da morfologia espermática constitui um parâmetro fundamental na avaliação da qualidade seminal, devido a alta correlação com a fertilidade. Elevadas frequências de anormalidades espermáticas estão associadas à redução do potencial reprodutivo, frequentemente decorrente de alterações durante a fase de maturação espermática e de comprometimentos na integridade do epitélio seminífero (ARRUDA et al., 2015). Dessa forma, a identificação da frequência no ejaculado de defeitos morfológicos assume papel decisivo na seleção de reprodutores, podendo levar à desqualificação de indivíduos que apresentem comprometimento significativo no processo da espermatogênese, tornando o macho subfértil, infértil temporário ou estéril.

De acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), as anormalidades espermáticas são classificadas em defeitos maiores e menores, os quais podem ser visualizados por microscopia óptica convencional, microscopia de contraste de fase ou microscopia de contraste de fase diferencial (DIC). A avaliação pode ser realizada a partir de esfregaços corados ou lâminas em preparação úmida, sendo imprescindível que as técnicas empregadas sejam descritas no laudo andrológico (ARRUDA et al., 2011).

Em condições fisiológicas, a fração espermática do ejaculado pode conter entre 5 e 10% de células com anormalidades morfológicas sem comprometer significativamente a fertilidade. No entanto, quando a proporção de espermatozoides anormais excede 20 a 25%, observa-se impacto negativo na capacidade fecundante dos espermatozoides (MAIA, 2010). A frequência de defeitos morfológicos pode variar em função de fatores como estação do ano, temperatura ambiente, idade (especialmente em machos na fase puberal), nutrição, presença de enfermidades e exposição a agentes estressores (MAIA, 2010).

Os critérios estabelecidos pelo CBRA (2013) para sêmen fresco determinam que o percentual total de espermatozoides anormais não deve ultrapassar 30%. Para sêmen criopreservado, a recomendação estabelece limites máximos de 20% para defeitos totais e 10% para defeitos maiores, visto que anormalidades estruturais podem comprometer a viabilidade pós-descongelamento e a funcionalidade espermática.

2.4.4 Integridade de membranas e viabilidade celular

A membrana espermática, caracterizada por sua elevada concentração de ácidos graxos poliinsaturados, desempenha papel essencial na manutenção da fluidez necessária para os eventos de fusão gamética. No entanto, essa composição a torna particularmente suscetível aos danos induzidos pelo estresse oxidativo, decorrente da produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (ROS) (ARINHO et al., 2016). A integridade da membrana plasmática (IMP) constitui requisito essencial para a ocorrência dos processos fisiológicos fundamentais à fertilização, incluindo a capacitação espermática, a adesão à zona pelúcida, a reação acrossomal e a fusão dos gametas (PAPA et al., 2000).

A avaliação da integridade das membranas espermáticas assume particular importância na criopreservação, uma vez que essas estruturas são altamente sensíveis às crioinjúrias, impactando diretamente a viabilidade espermática (THUN, HURTADO e JANETT, 2002). Diversas metodologias têm sido empregadas para a análise da IMP, incluindo colorações supravitais, como Tripan-Blue-Giemsa e Eosina-Nigrosina, testes hiposmóticos, além do uso crescente de fluoróforos que reagem com enzimas citoplasmáticas ou interagem com o DNA espermático (BRITO et al., 2003; TARTAGLIONE e RITTA, 2004; ARRUDA et al., 2005; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, 2005).

Dentre essas abordagens, a combinação de fluorocromos e sua análise por microscopia de epifluorescência ou citometria de fluxo destacam-se como estratégias robustas na determinação da IMP, fornecendo dados quantitativos sobre a permeabilidade relativa das membranas e permitindo a diferenciação precisa entre células viáveis e não viáveis (RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, 2003).

2.5 Técnicas de preservação seminal, fundamentos da técnica e importância na reprodução assistida

A preservação seminal é um componente essencial das biotecnologias reprodutivas, permitindo a conservação e utilização futura de material genético de machos de alto valor zootécnico (LÔBO et al., 2007) e de espécies selvagens (MAGNOTTI et al., 2018; HERRERA-BARRAGÁN et al., 2024). As principais técnicas incluem a refrigeração, a criopreservação e a liofilização, cada uma apresentando vantagens e limitações dependendo da espécie e do objetivo do armazenamento seminal.

2.5.1 Criopreservação

A criopreservação é uma biotecnologia amplamente utilizada para o armazenamento a longo prazo de células e tecidos, possibilitando aplicações em pesquisa científica e clínica reprodutiva. Essa técnica tem sido aplicada com sucesso em procedimentos como transplante de hepatócitos e ilhotas pancreáticas, transfusão sanguínea, transplante de medula óssea, inseminação artificial (IA) e em algumas etapas em programas de produção *in vitro* de embriões (WHALEY et al., 2021).

2.5.1.1 Princípios biológicos da criopreservação

O princípio subjacente à criopreservação baseia-se na redução drástica das reações bioquímicas e fisiológicas em temperaturas extremamente baixas, promovendo estado de quiescência celular e permitindo a preservação de biomateriais por longos períodos (PEGG, 2002; JANG et al., 2017; SHARMA e SHARMA, 2022).

2.5.1.2 Aplicações na reprodução animal

Na reprodução animal, a criopreservação seminal tem sido amplamente empregada na conservação do material genético de reprodutores melhoradores, linhagens transgênicas e espécies ameaçadas de extinção (BAILEY, MORRIER e CORMIER, 2000; BAILEY, MORRIER e CORMIER, 2003). Além disso, sua associação com biotecnologias reprodutivas avançadas, como FIV e injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), tem permitido o aprimoramento da eficiência reprodutiva e a perpetuação da integridade estrutural e funcional dos espermatozoides após descongelamento (HOLT, 2000; KUMAR, 2019).

2.5.1.3 Etapas do processo de criopreservação seminal

O processo de criopreservação seminal compreende uma série de etapas essenciais que visam preservar a viabilidade e funcionalidade espermática durante o armazenamento em temperaturas ultrabaixas. Inicialmente, os espermatozoides são diluídos em meios específicos formulados para proporcionar condições ideais de nutrição, osmolaridade, pH e estabilidade eletroquímica, fundamentais para a manutenção da integridade celular. Segue-se a etapa de resfriamento inicial, na qual a temperatura é reduzida gradualmente, a taxas controladas de aproximadamente 1 a 5 °C por minuto, até atingir o ponto de

solidificação. Esse procedimento favorece a adaptação celular ao estresse térmico, minimizando danos estruturais decorrentes da transição para temperaturas criogênicas (HOLT, 2000; GRÖTTER et al., 2019).

Posteriormente, ocorre o congelamento, caracterizado pela diminuição abrupta da temperatura, frequentemente por meio da exposição ao vapor de nitrogênio líquido, culminando no armazenamento a -196°C . A fase final do processo consiste no descongelamento, um procedimento que demanda rigoroso controle térmico e de reidratação celular, visando mitigar os efeitos deletérios do choque térmico e garantir a recuperação da célula espermática (HOLT, 2000; GRÖTTER et al., 2019).

2.5.1.4 Impacto da criopreservação na qualidade espermática

Embora eficiente, a criopreservação pode causar danos celulares, levando à redução da viabilidade espermática e da fertilidade pós-descongelamento (BAILEY, 2000). Entre os fatores que influenciam a criotolerância espermática, destacam-se diferenças inter e intraespecíficas na composição lipídica e proteica da membrana plasmática, além da permeabilidade a crioprotetores (GILMORE et al., 2000; LV et al., 2018).

Neste contexto, estudos demonstram que espermatozoides de touros, cavalos e javalis apresentam maior sensibilidade ao congelamento em comparação com humanos, coelhos, cães e gatos (BARBAS e MASCARENHAS, 2009). Quando analisadas focando a composição de membrana plasmática, observou-se que as espécies com maior resistência à criopreservação apresentavam proporções superiores de ácidos graxos poli-insaturados, bem como concentrações elevadas de colesterol, em comparação àquelas com menor tolerância ao processo (WATSON, 1981). Esses achados reforçam a necessidade de determinar protocolos padrões de criopreservação para cada espécie e indivíduo.

2.5.2 Fatores críticos na criobiologia espermática

A criobiologia espermática enfrenta desafios substanciais devido às transições entre os estados líquido e sólido da água durante a criopreservação celular. Durante o processo de congelamento e subsequente descongelamento, a faixa de temperatura entre -15 e -60°C é considerada crítica devido ao aumento da letalidade celular (GAO e CRISTER, 2000; MAZUR, 2004).

Inicialmente, tanto as células quanto o meio extracelular permanecem em estado líquido e super-resfriado a aproximadamente $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$. À medida que a temperatura decresce para valores entre -5 e $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, inicia-se a nucleação do gelo no meio extracelular, enquanto o citoplasma celular ainda se mantém em estado líquido, próximo ao ponto de nucleação. O gradiente de potencial químico entre a água intracelular super-resfriada e a água extracelular congelada induz um fluxo osmótico, promovendo a desidratação celular e favorecendo o congelamento extracelular (GAO e CRISTER, 2000).

A cinética desse processo é diretamente modulada pela taxa de resfriamento adotada: resfriamento excessivamente rápido impede a migração eficiente da água para o meio extracelular, resultando na formação de cristais de gelo intracelulares, um fenômeno altamente deletério. Por outro lado, taxas de resfriamento muito lentas favorecem a desidratação celular excessiva, levando ao encolhimento da célula e comprometendo a integridade estrutural da membrana plasmática e organelas. Assim, a taxa de resfriamento ideal deve ser suficientemente lenta para evitar a nucleação intracelular, mas rápida o bastante para mitigar danos associados à criolesão (GAO e CRISTER, 2000; BAUST, GAO e BAUST, 2009; YANG et al., 2023).

Mesmo sob protocolos de resfriamento otimizados, danos celulares ainda ocorrem devido à interação complexa de estressores físicos e químicos, incluindo a formação de gelo intracelular, variações abruptas de temperatura, estresse oxidativo e osmótico (ACKER et al., 1999; CHATTERJEE e GAGNON, 2001). A estabilidade da membrana plasmática é um determinante crítico da criotolerância espermática, pois modificações estruturais e funcionais induzidas pela criopreservação comprometem a viabilidade celular.

Em condições fisiológicas, a membrana encontra-se em estado fluido; contudo, variações extremas de temperatura induzem mudanças na sua consistência, promovendo a desorganização de seus componentes e comprometendo sua estabilidade. Os constituintes da membrana (proteínas, lipídios e esteróis) apresentam propriedades biofísicas distintas e suscetíveis a alterações irreversíveis, sendo que modificações induzidas pelo estresse térmico representam um dos principais determinantes da perda da integridade estrutural e funcional celular (MAZUR, 1984; GOUSSET, 2002).

Além do impacto direto da temperatura, a desestabilização da membrana também decorre de variações volumétricas expressivas associadas ao fluxo osmótico de água e à interação com crioprotetores. Alterações na permeabilidade hidráulica da membrana, composição de fosfolipídios, limites de tolerância osmótica e conteúdo de colesterol são eventos característicos da criopreservação espermática, e acredita-se que tais mudanças estejam diretamente envolvidas na perda da homeostase celular (MAZUR, 1984; HAMMERSTEDT, GRAHAM e NOLAN, 1990).

Entre os mecanismos estruturais envolvidos nesses processos, a transição da fase fluida para a fase cristalina é um evento crucial para a manutenção da funcionalidade da membrana. Fosfolipídios com cadeias de ácidos graxos predominantemente poli-insaturadas, ao serem submetidos à redução da temperatura, tendem a adotar uma conformação cônica, resultando na formação de estruturas hexagonais invertidas, conhecidas como micelas invertidas.

Durante essa transição, para muitos lipídios, a configuração hexagonal é apenas transitória; entretanto, para determinados fosfolipídios, essa estrutura persiste, promovendo aumento da permeabilidade da membrana e estabelecendo canais que facilitam a entrada de íons e pequenas moléculas. Tal processo pode levar à desestabilização da membrana e, conseqüentemente, causar danos irreversíveis à célula (AMANN e PICKETT, 1987; PARKS e GRAHAM, 1992; WATSON, 1995; VISHWANATH e SHANNON, 1997; KHOSROBEYGI e ZARGHAMI, 2007).

Portanto, independentemente da estratégia de resfriamento empregada, tanto taxas elevadas quanto excessivamente lentas podem resultar em criolesão celular, reforçando a necessidade de protocolos otimizados para maximizar a viabilidade espermática pós-descongelamento (GAO e CRISTER, 2000; BAUST, GAO e BAUST, 2009).

2.5.3 Liofilização Seminal: Fundamentos, Mecanismos de Desidratação e Desafios

A água é um componente essencial para a vida, representando cerca de 70-90% da composição dos organismos procariontes e eucariontes. Sua presença é indispensável para a manutenção do ambiente intracelular, no qual ocorrem processos biológicos fundamentais, incluindo a interação com biomoléculas e membranas, a regulação estrutural do DNA e a estabilidade das proteínas (BILLY e POTTS, 2001).

Entretanto, diversos organismos desenvolveram estratégias para sobreviver à desidratação extrema, mantendo sua viabilidade por períodos prolongados, fenômeno conhecido como anidrobiose (CROWE et al., 1992; CHAPLIN, 2001; RAMLØV e WESTH, 2001).

2.5.3.1 Mecanismos de adaptação à desidratação

Os organismos anidrobióticos possuem mecanismos especializados que lhes permitem suportar condições extremas. Um dos fatores-chave é a produção de compostos protetores conhecidos como xeroprotetores, que incluem açúcares como trealose e sacarose, proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant), proteínas de choque térmico e antioxidantes. Esses compostos desempenham papel fundamental na manutenção da integridade celular durante a dessecação e subsequente reidratação (CROWE, CROWE e CHAPMAN, 1984; LESLIE et al., 1995; GOYAL et al., 2005).

Embora a anidrobiose seja uma estratégia eficiente para a preservação celular, vertebrados não possuem genes associados à dessecação. Como resultado, a estabilização de células de mamíferos requer a administração exógena de xeroprotetores antes da remoção da água celular para níveis críticos (BELOTT, JANIS e MENZE, 2020; CZERNIK et al., 2020; ANDERSON e HANDI, 2021).

Atualmente, a desidratação é amplamente reconhecida como a estratégia mais eficaz para a estabilização de biomoléculas e materiais biológicos a longo prazo. Estudos sobre os mecanismos adaptativos de organismos anidrobióticos, capazes de tolerar a perda extrema de água, forneceram informações fundamentais para o desenvolvimento de abordagens biotecnológicas voltadas à preservação estrutural e funcional de biomoléculas no estado seco. Esses conhecimentos sustentam métodos avançados de desidratação, como a liofilização.

2.5.3.2 Princípios e mecanismos da liofilização

Ao contrário da desidratação tradicional, que se vale da evaporação, a liofilização repousa sobre a transição direta da fase sólida (gelo) para a fase de vapor (gás), fenômeno conhecido como sublimação. Em dispositivos liofilizadores, a fase líquida é evitada ao manter-se uma temperatura suficientemente baixa sob vácuo acentuado, suprimindo energia

necessária (calor latente) para viabilizar a transição de fase. O vapor resultante da sublimação é então condensado no condensador, mantido em temperatura inferior à do material sendo liofilizado, garantindo baixa pressão de vapor ao redor deste (HOCHI et al., 2011).

2.5.3.3 Etapas do processo de liofilização

O processo liofilizante compreende, metodologicamente, duas fases subsequentes ao congelamento das amostras: a etapa de secagem primária (sublimação), na qual o gelo é sublimado sob vácuo à temperatura de congelamento, e a etapa de secagem secundária, caracterizada pela dissorção gradual com elevação controlada da temperatura sob vácuo (SARAGUSTY et al., 2020; LOI et al., 2021; WENG, 2021). Este processo culmina em desidratação considerável, abrangendo não somente a remoção de água livre, mas também da água em estado ligado, resultando na supressão significativa de reações químicas indesejadas.

2.5.3.4 Riscos e desafios da liofilização espermática

A liofilização não está isenta de riscos, especialmente nos estágios críticos de congelamento e secagem, os quais impõem diferentes tipos de estresse às biomoléculas e seus agregados, demandando considerações minuciosas para garantir a estabilidade ao longo do procedimento. Estratégias para estabilizar as proteínas durante o congelamento, por exemplo, incluem a introdução de co-solventes que seletivamente evitam a ligação à superfície da proteína (ARAKAWA e TIMASHEFF, 1982; CROWE et al., 1998).

2.5.3.5 Eventos químicos e físicos da liofilização

Durante o processo de secagem, a remoção da água resulta na perda da camada de hidratação ao redor das cabeças polares dos fosfolipídios, promovendo empacotamento mais compacto dessas moléculas. A redução na distância intermolecular intensifica as interações de van der Waals, favorecendo aumento na coesão entre os fosfolipídios e elevação da temperatura de transição de fase (T_m). Esse fenômeno induz a conversão da

membrana de um estado de cristal líquido para uma conformação de fase gel (RINDLER, 2000).

Exemplificamente, no caso do 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina (POPC), a transição de fase ocorre a -7°C quando hidratado, mas é deslocada para 57°C no estado anidro. Assim, à temperatura ambiente, membranas desidratadas assumem predominantemente estrutura de fase gel (CROWE et al., 1986; CROWE et al., 1997). Esse rearranjo estrutural ocorre de forma heterogênea ao longo da membrana, podendo comprometer sua integridade e resultar na liberação de componentes intracelulares (CROWE et al., 1987; CROWE, CARPENTER e CROWE, 1998). Além disso, a redução do espaçamento intermolecular entre fosfolipídios durante a secagem pode facilitar eventos de fusão de membrana, contribuindo para o aumento da permeabilidade e potencial vazamento de conteúdos celulares (CROWE et al., 1997; CROWE, CARPENTER e CROWE, 1998).

Paralelamente, organelas e proteínas intracelulares também são suscetíveis aos efeitos deletérios da desidratação, uma vez que a perda de água afeta as interações de hidrogênio estabilizadoras entre proteínas, água e outras biomoléculas. A aproximação forçada dessas estruturas favorece processos de agregação e reações indesejadas, intensificando os danos estruturais (CROWE et al., 1997; CROWE, CARPENTER e CROWE, 1998; RINDLER, 2000; FAN et al., 2011).

Embora a reidratação não seja parte intrínseca do ciclo de liofilização, ela representa um fator crítico para a viabilidade celular. No momento da reidratação, os excipientes dissolvem-se rapidamente no meio aquoso, enquanto a membrana celular, ainda na fase gel, constitui uma barreira semipermeável. Esse cenário gera um estresse osmótico significativo, que pode comprometer a sobrevivência de células previamente afetadas (RINDLER, 2000; FAN et al., 2011).

Com a reintrodução da água, os fosfolipídios gradualmente retomam sua conformação original, restaurando o espaçamento lateral entre as cabeças polares e reduzindo a T_m para valores inferiores. Conseqüentemente, a membrana passa por uma transição reversa da fase gel para o estado de cristal líquido, permitindo a reorganização estrutural, mas também potencializando a liberação de componentes intracelulares para o meio extracelular (RINDLER, 2000).

2.5.3.6 Impacto da Liofilização na Integridade Cromossômica dos Espermatozoides

A liofilização de espermatozoides envolve processos críticos, como congelamento,

desidratação e exposição ao vácuo, que impõem desafios significativos à integridade celular. Durante cada uma dessas etapas, danos ao DNA espermático podem ser induzidos, impactando diretamente a viabilidade e a funcionalidade reprodutiva dos gametas. Tais lesões cromossômicas podem comprometer o desenvolvimento embrionário inicial, contribuindo para falhas na implantação e perda embrionária precoce. Além disso, à ocorrência de aberrações cromossômicas menores, conforme descrito por Szczygiel e Ward (2002), Kaneko e Nakagata (2006), e Singer et al. (2006), representa um aspecto relevante sob a ótica da toxicologia genética.

A estabilidade cromossômica dos espermatozoides liofilizados pode ser adversamente afetada tanto pelo próprio processo de liofilização quanto pelo armazenamento subsequente em temperatura ambiente. Estudos que avaliaram a integridade do DNA espermático em diferentes espécies de animais de produção têm demonstrado variações significativas nos níveis de fragmentação, dependendo do meio utilizado para liofilização, da temperatura de armazenamento e do teste empregado para análise. A Tabela 1 resume os achados de diferentes autores quanto à fragmentação do DNA em espermatozoides submetidos à liofilização.

Tabela 1: Fragmentação do DNA espermático em diferentes espécies animais de produção, de acordo com o meio de preservação (MEIO), temperatura de armazenamento (ARMAZ. (°C)), método de análise (TESTE) e percentual de fragmentação observado (F.%).

ESPÉCIE	MEIO	ARMAZ. (°C)	TESTE	F. (%)	AUTORES
Ovinos	TCM199,10% de Soro Fetal Bovino (SFB)	4°C	Acridine O.	5,2%	Üstüner <i>et al.</i> (2021)
	TRIS,50 mmol/L de NaCl,10 mmol/L de EGTA	4°C	Túnel	6,1%	Üstüner <i>et al.</i> (2021)
	1,0 M de trealose,5 mM de glicose,10 mM de KCl, 20 mM de HEPES e 10 µg/ml de Trolox	---	Acridine O. (Citometria de Fluxo)	9,9%	Palazzese <i>et al.</i> (2020)
Caprinos	10 mM Tris-HCl, 50 mM ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e 50 mM NaCl	4°C	Acridine O.	1,4%	Thiangthientham <i>et al.</i> (2023)
Bovinos	10 mmol/L de Tris-HCl tamponado,50 mmol/L de NaCl,50 mmol/L EGTA	---	Túnel	2,0%	Martins <i>et al.</i> (2007)

	EGTA (10 mM Tris-HCl, Wako, Osaka, Japão; 50 mM EGTA; e 50 mM NaCl	4°C	Cometa Alcalino	5,4%	Hara <i>et al.</i> (2011)
	Tampão EGTA sem NaCl, 0,5 M de trealose	-20	Cometa Alcalino	6,8%	Hara <i>et al.</i> (2014)
Bubalinos	10 mmol/L de Tris e 1 mmol/L de EDTA	4°C	Cometa	9,3%	Shahba <i>et al.</i> (2016)
	10 mmol/L de Tris-HCl tamponado, 50 mmol/L de NaCl, 50 mmol/L de EGTA	-20°C	Cometa	15,3%	Shahba <i>et al.</i> (2016)
	10 mmol/L de Tris e 1 mmol/L de EDTA	-80°C	Cometa	11,3%	Shahba <i>et al.</i> (2016)
Suínos	10 mM EDTA, 117 mM sorbitol, 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl e 150 mM lactose	---	Acridine O.	1,0%	García <i>et al.</i> (2014)
	EGTA, 105 µM de Ácido Rosmarínico	4°C	Teste De Dispersão Da Cromatina Modificado	0,7%	Olaciregui <i>et al.</i> (2017)
Equinos	DMEM/F-12 (Sigma-Aldrich), 10% SFB	4°C	Acridine O. (Citometria de Fluxo)	5,6%	Choi <i>et al.</i> (2011)

Os danos induzidos podem ser classificados em danos cromossômicos primários (PCD) e danos cromossômicos acumulados (ACD). O PCD ocorre imediatamente após a liofilização, enquanto o ACD se manifesta ao longo do período de armazenamento pós-liofilização. Ambas as formas de lesão, incluindo quebras no DNA e remodelação anômala da cromatina, podem comprometer a integridade estrutural e funcional dos gametas, conforme reportado por Tateno e Kamiguchi (2005) e Kusakabe e Tateno (2011).

2.5.3.7 Diferentes parâmetros da liofilização e impacto na viabilidade espermática

Kwon, Park e Niwa (2004) observaram que a extensão do período de liofilização pode afetar negativamente a capacidade do espermatozoide suíno de contribuir para o desenvolvimento embrionário *in vitro*. Corroborando, Kawase et al. (2007) resalta a relevância da pressão de vácuo na fase inicial de desidratação de espermatozoides de camundongos, indicando que pressões específicas influenciam o desenvolvimento embrionário subsequente.

As discrepâncias nos resultados podem ser atribuídas à interação de diversos fatores, como a variedade de equipamentos utilizados, a composição específica do meio de liofilização e as características intrínsecas da amostra em análise. Estudos prévios evidenciaram considerável variação nas pressões de câmara adotadas durante a fase primária de secagem, abrangendo ampla faixa, desde 0,001 mbar até 0,37 mbar (WAKAYAMA e YANAGIMACHI, 1998; KAWASE et al., 2007).

Diante disso, torna-se imperativa a realização de investigações adicionais para estabelecer a relação precisa entre a pressão da câmara, a temperatura e a duração do processo de secagem no contexto específico da liofilização do sêmen. A Tabela 2 apresenta as diversas condições aplicadas à liofilização do sêmen em diferentes espécies animais, abordando aspectos como pressão e tempo de exposição ao processo de desidratação a vácuo.

Tabela 2: Condições experimentais aplicadas à liofilização de sêmen em diferentes espécies de animais, incluindo os valores de pressão (mBar) e tempo (h) de exposição durante a fase de desidratação a vácuo, conforme descrito por diferentes autores.

ESPÉCIE	PRESSÃO (mBar)	TEMPO (h)	AUTORES
Bovinos	0.19	12–18	Keskintepe <i>et al.</i> (2002)
	0.35	12–16	Martins <i>et al.</i> (2007)
	0.37 e 0.001	14 e 3	Abdalla <i>et al.</i> (2009)
	0.37 e 0.001	14 e 3	Hara <i>et al.</i> (2011)
	1.98, 0.57 ou 0.12	6	Hara <i>et al.</i> (2014)
Bubalinos	0.001	12-16	Shahba <i>et al.</i> (2016)
Ovinos	0.053 e 0.018	--	Olaciregui <i>et al.</i> (2017)
	0.006	24	Palazzese <i>et al.</i> (2018)
	0.001	12	Anzalone <i>et al.</i> (2018)
	0.35	12-16	Üstüner <i>et al.</i> (2021)
Caprinos	--	6	Thiangthientham <i>et al.</i> (2023)
Equinos	0.13	30	Choi <i>et al.</i> (2011)
Suínos	0.039	4-24	Kwon, Park e Niwa (2004)
	0.13	19 e 3	Men <i>et al.</i> (2013)
	0.015 e 0.005	24 e 6	García <i>et al.</i> (2014)
	0.053 e 0.018	--	Olaciregui <i>et al.</i> (2017)
Cães	0.37 e 0.001	--	Watanabe <i>et al.</i> (2009)
Gatos	0.16	4	Ringleb <i>et al.</i> (2011)
Coelhos	0.023 – 0.040	4	Liu <i>et al.</i> (2004)
Ratos	0.001	12	Wakayama e Yanagimachi(1998)
	0.030 - 0.033	4	Kaneko <i>et al.</i> (2003)
	0.037	4	Kaneko e Nakagata (2005)
	0.040 e 0.001	8 e 6	Kawase <i>et al.</i> (2005)
	0.030 e 0.045	4	Kaneko, Nakagata (2006)
	0.04, 0.37 ou 1.03	--	Kawase <i>et al.</i> (2007)
	0.032 - 0.040	4	Kusakabe, Yanagimachi e Kamiguchi (2008)

	0.37 e 0.001	13 e 6	Kawase, Wada e Jishage (2009)
	0.038 e 0.058	4	Kaneko e Serikawa (2012)
Galos	0,006	2	Stanishevskaya <i>et al.</i> (2022)

2.5.3.8 Condições de armazenamento do sêmen liofilizado

Estudos recentes demonstram que o sêmen liofilizado pode manter sua viabilidade por períodos significativamente longos. Pesquisadores japoneses conseguiram produzir descendentes saudáveis a partir de sêmen de camundongos liofilizado armazenado por quase seis anos na Estação Espacial Internacional, sugerindo uma possível viabilidade de até 200 anos, mesmo em um ambiente com níveis de radiação 100 vezes maiores do que na Terra, o espaço (WAKAYAMA *et al.*, 2021).

Além disso, pesquisas com sêmen canino revelaram que, mesmo após 12 meses de armazenamento a 22 °C, é possível preservar parcialmente a integridade do DNA espermático, especialmente quando armazenado a 4 °C (OLACIREGUI *et al.*, 2015). Em ovinos, Palazzese *et al.* (2018) demonstraram que a combinação de congelamento lento seguido de liofilização resultou em maior taxa de desenvolvimento embrionário por ICSI. Complementarmente, Rajska *et al.* (2021) em uma revisão abrangente, destacam o potencial da liofilização para conservação genética de longo prazo, com vantagens logísticas e econômicas, especialmente para biobancos e conservação de espécies ameaçadas.

Diversos estudos foram conduzidos abrangendo diversas espécies animais, visando a preservação e conservação do material genético masculino. Os espermatozoides submetidos à liofilização foram protegidos por diferentes soluções, visando a preservação da viabilidade e integridade celular. Notavelmente, a combinação de trealose e Ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), em conjunto com a técnica de Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI), demonstrou as mais altas taxas de fertilização e desenvolvimento embrionário (MARTINS *et al.*, 2007).

Apesar de muitos dos estudos mais duradouros terem sido realizados em espécies-modelo, os avanços obtidos sugerem caminhos promissores para a aplicação em pequenos ruminantes, como os caprinos, especialmente em protocolos que integrem a ICSI. Embora a criopreservação permita conservação por décadas, os dados aqui apresentados demonstram que a liofilização, aliada a estratégias como a ICSI e o uso de lioprotetores adequados, pode se aproximar desse desempenho, com ganhos significativos em logística, biossegurança e sustentabilidade.

2.6 Excipientes

Diversos excipientes com estruturas químicas distintas têm sido empregados para promover a estabilização de células e proteínas durante os processos de congelamento e secagem. Considerando que o congelamento e a secagem impõem estresses físico-químicos diferentes sobre proteínas e células, é imperativo que estratégias de proteção específicas sejam adotadas para cada um desses processos (CROWE et al., 1997).

Em razão disso, os excipientes podem ser categorizados em dois grupos principais: lioprotetores e crioprotetores (CPA). Os lioprotetores são compostos que favorecem a manutenção da estabilidade durante as etapas de congelamento e secagem, enquanto os crioprotetores conferem maior estabilidade no contexto de congelamento/descongelamento, apresentando efeito limitado durante a secagem (PIKAL, 1994).

2.6.1 Toxicidade dos excipientes

A toxicidade associada ao uso de excipientes estabilizantes deve ser cuidadosamente considerada, especialmente no contexto dos crioprotetores (CPAs). A toxicidade dos CPAs pode ser subdividida em dois tipos: (i) toxicidade específica, que afeta as células alvo, como a polimerização do citoesqueleto de actina no esperma de garanhão induzida por glicerol em concentrações superiores a 1,5 M, e (ii) toxicidade não específica, comumente avaliada para todos os excipientes empregados. A toxicidade específica dos CPAs tem sido amplamente discutida na literatura, enquanto a toxicidade dos lioprotetores é menos abordada. A concentração dos CPAs é um fator determinante, pois deve ser suficientemente elevada para garantir a estabilização das células, embora sua concentração excessiva possa estar associada a um aumento da toxicidade potencial (BEST, 2015).

2.6.2 Trealose

Trealose, um dissacarídeo não redutor, é amplamente reconhecida na preservação de células, especialmente em processos de secagem, e é comumente encontrada em organismos anidrobióticos. Seu papel fundamental na estabilização de biomateriais em estado seco tem sido amplamente documentado, embora os mecanismos subjacentes ainda não sejam completamente elucidados (LESLIE et al., 1994; CROWE et al., 2005).

Em comparação a outros açúcares, a trealose apresenta características distintas que a tornam de interesse especial, sendo estudada em técnicas para sua introdução intracelular. Um aumento na temperatura de transição de fase (T_m) durante a secagem

está associado ao vazamento celular, particularmente na reconstituição do material. A trealose tem a capacidade de mitigar esse efeito, reduzindo a T_m em cerca de 10 °C em comparação à membrana completamente hidratada, e até 80 °C para a bicamada lipídica seca (LESLIE et al., 1994; CROWE, CARPENTER e CROWE, 1998).

Esse fenômeno sugere que, mesmo em estado seco, a membrana celular permanece em uma fase líquida cristalina, evitando a transição de fase crítica durante os processos de secagem e reidratação (CROWE, CARPENTER e CROWE, 1998; HAYS et al., 2001; CROWE et al., 2005).

2.7 Histórico, perspectivas futuras e aplicações biotecnológicas

Diversas tentativas em estabelecer a conservação espermática por liofilização foram realizadas ao longo dos anos. Amostras de sêmen, apresentando motilidade espermática após a liofilização foram obtidas por Polge *et al.* (1949) em aves (50%), Albright, Erb e Ehlers (1958) em touros (5-10%) e por Jeyendran, Graham e Schmehl (1981) (5-20% em diferentes níveis de desidratação) na mesma espécie.

Yushchenko (1957) relatou o nascimento de 12 ninhadas de coelhos normais usando espermatozoides liofilizados. Meryman (1960) comunicou que vacas ficaram prenhas após inseminação artificial com espermatozoides liofilizados, e recentemente, Stanishevskaya e colaboradores (2022) relataram a obtenção de um ovo fertilizado e outros sete, de um total de oito, apresentaram pontos de interação na membrana perivitelina.

O ano de 1992 marcou a publicação do relatório de Katayose, Matsuda e Yanagimachi, no qual eles forneceram descobertas sobre as células espermáticas, relataram que o núcleo do gameta masculino liofilizado de camundongos e humanos mesmo não apresentando potencial cinético após seu processamento, ainda retinham sua capacidade de desenvolver pró-núcleo e sintetizar DNA com sucesso.

A produção subsequente empregando sêmen liofilizado, salvo as citações acima, só foi relatada após associação da técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), com relatos de embriões ou nascidos vivos em diversas espécies ao longo dos anos (Tabela 3).

Inúmeros estudos já foram realizados envolvendo uma variedade de animais, com o objetivo de preservação e conservação do genoma masculino. Os espermatozoides liofilizados foram submetidos a diversas formas de soluções de proteção a fim de

preservar sua viabilidade e integridade, onde, as maiores taxas de fertilização e formação de embriões foram alcançadas pela utilização de trealose e EGTA, em conjunto com ICSI (MARTINS *et al.*, 2008).

Apesar do crescente volume de pesquisas nessa área, ainda há desafios a serem superados, especialmente no contexto dos ruminantes. Os estudos envolvendo espermatozoides liofilizados não alcançaram resultados comercialmente satisfatórios, devido à necessidade de integrar a liofilização com a técnica de ICSI para garantir o desenvolvimento embrionário bem-sucedido (KESKINTEPE *et al.*, 2002).

O cenário científico nessa área ainda oferece vastas oportunidades de exploração, especialmente no âmbito dos espermatozoides de animais de produção. O progresso alcançado até agora é indicativo da importância dessa biotecnologia para o futuro. Uma estratégia adicional que pode trazer benefícios, juntamente com a liofilização e a ICSI, é a implementação do sistema piezo-drive. Esse sistema utiliza vibrações piezoelétricas para introduzir de forma segura os espermatozoides liofilizados no oócito, minimizando qualquer possível dano (MARTINS *et al.*, 2008).

Tabela 3. Liofilização espermática de diferentes espécies, de acordo a cronologia do evento e produtos obtidos.

ESPÉCIE	RESULTADO OBTIDO	AUTORES
Camundongos	Nascimento	Wakayama e Yanagimachi (1998)
	Nascimento	Kusakabe <i>et al.</i> (2001)
	Nascimento	Ward <i>et al.</i> (2003)
	Nascimento	Kawase e Suzuki (2011)
	Nascimento	Wakayama <i>et al.</i> (2017)
	Nascimento	Ito <i>et al.</i> (2019)
	Nascimento	Kusakabe <i>et al.</i> (2019)
	Nascimento	Ito <i>et al.</i> (2021)
Hamsters	Nascimento	Muneto e Horiuchi (2011)
Ratos	Nascimento	Hirabayashi <i>et al.</i> (2005)
	Embrião	Kawase (2005)
	Embrião	Kawase <i>et al.</i> (2007)
	Nascimento	Hochi <i>et al.</i> (2008)
	Nascimento	Kaneko, Kimura e Nakagata (2009)
	Embrião	Kawase e Suzuki (2011)
	Nascimento	Kaneko e Serikawa (2012)
	Nascimento	Kaneko (2015)
Coelhos	Nascimento	Liu <i>et al.</i> (2004)
Gatos	Embrião	Moisan <i>et al.</i> (2005)
Suínos	Embrião	Kwon, Park e Niwa (2004)
	Embrião	Nakai <i>et al.</i> (2007)
	Embrião	Meng <i>et al.</i> (2010)
	Embrião	Men <i>et al.</i> (2013)

	Embrião	Olaciregui <i>et al.</i> (2017)
Ovinos	Embrião	Olaciregui <i>et al.</i> (2017)
	Embrião	Palazzese <i>et al.</i> (2018)
	Embrião	Anzalone <i>et al.</i> (2018)
	Embrião	Keskintepe <i>et al.</i> (2002)
Bovinos	Embrião	Martins <i>et al.</i> (2007)
	Embrião	Hara <i>et al.</i> (2013)
	Embrião	Hara <i>et al.</i> (2014)
	Nascimento	Matsukawa (2020)
Equinos	Nascimento	Choi <i>et al.</i> (2011)

3 Material e Métodos

3.1 Local e Animais Experimentais

O experimento foi conduzido na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão (UEPE) em Caprinos e Ovinos da Universidade Federal de Viçosa (UFV), situada no município de Viçosa, estado de Minas Gerais, Brasil (20.773722° S, 42.852338° W). As condições meteorológicas durante o período experimental, foram obtidas a partir da Estação Meteorológica Automática da UFV. Nesse período, foi registrada uma precipitação total de 320,0 mm, com ocorrência de chuva (≥ 1 mm) em 23 dias ao longo do mês, caracterizando um ambiente de elevada umidade.

A temperatura média do ar foi de 22,2 °C, com valores médios das máximas de 27,9 °C e das mínimas de 18,6 °C. A umidade relativa média foi de 85%, e a insolação total somou 113,4 horas, indicando predominância de céu encoberto. A velocidade média do vento foi de 0,6 m/s, refletindo condições de baixa movimentação atmosférica. Essas variáveis meteorológicas refletem o padrão climático predominante no início da estação chuvosa na Zona da Mata mineira, caracterizada por elevados índices pluviométricos e umidade relativa.

Foram utilizados seis caprinos machos (*Capra aegagrus hircus*), clinicamente saudáveis, com idade entre 12 e 61 meses, histórico reprodutivo positivo, previamente comprovado por fertilização natural. Antes do início do experimento, todos os animais foram submetidos a uma avaliação clínica completa, incluindo exame físico geral, exame andrológico e teste de congelabilidade do sêmen. Adicionalmente, foi realizado o esgotamento da reserva extragonadal mediante coletas diárias de sêmen, com intervalo de 24 horas, por um período consecutivo de cinco dias, visando à padronização das amostras seminais antes da fase experimental. Foram incluídos apenas os animais cuja qualidade seminal atendeu aos critérios estabelecidos pelo CBRA (2013) para sêmen fresco e criopreservado. Ao longo de todo o período experimental, os animais foram mantidos sob

condições padronizadas de manejo, alojados individualmente em baias com dimensões de 11,30 × 3,20 m, das quais 6,10 m correspondiam à área de solário. As instalações eram bem ventiladas e apresentavam ambiente seco, assegurando conforto térmico e sanitário adequados à espécie. O fornecimento de água foi ad libitum, e a dieta foi formulada para atender às exigências nutricionais de reprodutores em manutenção, sendo composta por concentrado à base de farelo de milho e soja, além de volumoso proveniente de silagem de milho. A alimentação foi ofertada duas vezes ao dia, nos períodos da manhã e da tarde.

3.2 Coleta e Avaliação Seminal

As coletas seminais foram realizadas em sala apropriada (6 × 4 m), utilizando-se o método da vagina artificial, previamente aquecida com ar e água a uma temperatura entre 42 e 46 °C, utilizando uma cabra como manequim, previamente contida em brete individual.

Três ejaculados foram obtidos de cada reprodutor, totalizando 18 ejaculados, com intervalo mínimo de 48 h, totalizando três sessões semanais. Após a coleta, as amostras foram submetidas a avaliação inicial, sendo selecionadas apenas aquelas que apresentaram motilidade espermática progressiva $\geq 70\%$ e vigor espermático ≥ 3 , conforme CBRA (2013).

3.3 Avaliação de Motilidade e Vigor Espermático

Uma alíquota de 20 μL do ejaculado foi retirada e colocada em uma lâmina previamente aquecida a 37 °C. O turbilhonamento foi avaliado diretamente nesta gota, utilizando escala de 1 a 5, de acordo com a movimentação espermática coletiva em aumento de 100x. Em seguida, a gota foi coberta com uma lamínula também previamente aquecida, e a motilidade espermática foi avaliada pelo percentual de células que apresentavam motilidade espermática progressiva, analisando-se no mínimo três campos por lâmina. O vigor espermático foi classificado de acordo com a intensidade do movimento espermático, em escala de 1 a 5 (CBRA, 2013). Sendo realizadas em microscópio com contraste de fase (Olympus CX41) em aumento de 200x.

3.4 Diluição e Resfriamento Seminal

Após avaliados os parâmetros iniciais dos aspectos físicos do ejaculado, o sêmen foi pré-diluído utilizando o diluente BotuBov® (Botupharma, Botucatu, Brasil), ajustando o volume final para 2 mL. Amostras foram coletadas para avaliação da concentração espermática e da morfologia, sendo o volume remanescente transferido para tubos Falcon e submetido a resfriamento controlado a 5 °C, por um período de duas horas, em refrigerador convencional.

Para assegurar uma curva de resfriamento homogênea e gradual, os tubos foram acondicionados em suportes imersos em banho-maria, utilizando-se água como meio condutor térmico. A escolha da água deve-se à sua elevada condutividade térmica em comparação ao ar, o que permite a dissipação de calor mais eficiente e uniforme da amostra para o ambiente refrigerado, minimizando gradientes térmicos abruptos que poderiam comprometer a integridade celular.

Ao contrário do ar, que apresenta propriedades isolantes e tende a gerar resfriamento heterogêneo, com zonas de temperatura distintas entre o centro e as bordas do tubo, o meio aquoso proporciona transferência térmica constante e equilibrada ao longo de toda a superfície do recipiente. Tal característica favorece resfriamento isotérmico da amostra seminal, reduzindo o estresse térmico sobre os espermatozoides e, conseqüentemente, preservando melhor sua viabilidade funcional durante o armazenamento em curto prazo.

3.5 Avaliação de Concentração Espermática

Para determinação da concentração espermática, uma alíquota de cada amostra com 20 µL de sêmen foi diluída em 3.980 µL de água destilada (diluição 1:200). Após homogeneização, a solução sêmen:água destilada foi utilizada para preencher os dois retículos de uma câmara de Neubauer.

Após aguardar a sedimentação das células (60 segundos), todas as cabeças espermáticas presentes em cinco quadrados diagonalmente de cada lado da câmara foram contadas em microscópio óptico com contraste de fase (Olympus CX41), no aumento de 200x, conforme preconizado pelo CBRA (2013). A concentração espermática foi

calculada com base no número de células contadas, permitindo estimar a concentração por mL e do ejaculado.

3.6 Avaliação de Morfologia Espermática

Para a avaliação morfológica espermática, uma alíquota de 25 μ L do sêmen foi transferida para microtubos do tipo Eppendorf contendo 0,5 mL de solução de formol salino tamponado, previamente aquecida a 37 °C, a fim de promover a fixação celular. As amostras fixadas foram posteriormente analisadas por microscopia de contraste de fase (Olympus CX41), utilizando objetiva de imersão com aumento final de 1250x, em preparação úmida entre lâmina e lamínula. Para cada amostra, 200 espermatozoides foram avaliados, sendo determinada a proporção de células com anormalidades morfológicas no acrossoma, cabeça, peça intermediária e cauda. As alterações foram posteriormente classificadas em defeitos maiores, menores e totais, conforme os critérios descritos por Blom (1983) e em consonância com as recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

3.7 Congelamento Seminal

Após um período de resfriamento de duas horas a 5 °C, as amostras de cada ejaculado foram imediatamente diluídas conforme os grupos experimentais:

- **G1:** BotuBov® (controle);
- **G2:** BotuBov® + 0,2 M de Trealose Dihidratada;
- **G3:** BotuBov® + 0,5 M de Trealose Dihidratada.

A concentração espermática foi ajustada para 120×10^6 espermatozoides móveis/mL. As amostras foram alocadas em criotubos de 3 mL, previamente identificados, com três unidades por tratamento para cada animal. Cada criotubo continha 0,5 mL da amostra, correspondendo a 60×10^6 espermatozoides móveis por unidade. A escolha dos criotubos como recipiente de congelamento baseou-se em avaliação prévia, na qual diferentes tipos de recipientes (criotubos de 3 mL, palhetas de 0,5 mL e microtubos tipo Eppendorf) foram comparados utilizando-se um volume fixo de 0,5 mL. Os criotubos apresentaram melhor desempenho sob as condições experimentais, sendo, portanto, selecionados para a condução dos ensaios. As amostras foram então processadas em uma máquina de

congelamento programável (Cryogen®, Neovet), utilizando o programa "bovino 1". A curva de congelamento consistiu em duas rampas:

1. Taxa de congelamento de -5 °C/min até -20 °C ;
2. Taxa de congelamento de -20 °C/min até atingir -100 °C .

Após a conclusão da segunda rampa, os criotubos foram imersos em nitrogênio líquido, alcançando a temperatura de -196 °C , acondicionados em rackers adaptadas a fixação dos mesmos com auxílio de ligas elásticas, e armazenados temporariamente até as análises posteriores.

3.8 Liofilização Seminal

A liofilização das amostras criopreservadas foi conduzida utilizando liofilizador programável (Edwards, Modulyo), previamente estabilizado em temperatura de -55 °C . As amostras congeladas foram inseridas imediatamente na câmara de secagem do equipamento após retirada do botijão, o processo completo teve duração aproximada de 18 horas, garantindo a remoção eficiente da água. Após o término do processo, as amostras foram armazenadas à 5 °C até o momento de reidratação.

3.9 Reidratação das Amostras

As amostras liofilizadas foram reidratadas por adição inicial de $0,5\text{ mL}$ de água destilada, etapa realizada com o objetivo de mitigar o estresse osmótico decorrente da elevada osmolaridade da matriz residual. Imediatamente após, foram adicionados $1,5\text{ mL}$ do diluente comercial BotuBov®, promovendo a completa homogeneização do conteúdo e contribuindo para a redução da concentração de trealose por mililitro da amostra (T2 e T3). Em seguida, os criotubos foram submetidos à centrifugação a $300 \times g$ por 10 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente removido, e o pellet resultante foi ressuspensionado em $0,5\text{ mL}$ de BotuBov®, correspondente ao volume inicial utilizado. Todas as soluções empregadas foram previamente equilibradas à temperatura de 37 °C , a fim de preservar a viabilidade e funcionalidade espermática durante as manipulações.

3.10 Avaliação das Amostras Pós-Preservação

Após o descongelamento das amostras criopreservadas a 37 °C e a reconstituição das amostras liofilizadas, foi realizada uma nova avaliação dos parâmetros espermáticos previamente analisados, incluindo motilidade espermática progressiva, vigor espermático e morfologia espermática. Adicionalmente, foram realizados os testes hiposmótico e supravital em microscopia de contraste de fase (Olympus, modelo BX41) para avaliar a integridade e viabilidade das células espermáticas após os diferentes métodos de conservação.

3.11 Teste Hiposmótico

A integridade funcional da membrana plasmática espermática foi avaliada por meio do teste hiposmótico. Para isso, uma solução hiposmótica foi preparada com 9 g de D-frutose, 4,9 g de citrato de sódio e 1000 mL de água destilada (MARTINS et al. 2011), resultando em uma solução final com osmolaridade de 100 mOsm. Para a realização do teste, uma alíquota de 100 µL de sêmen foi adicionada a 1 mL da solução preparada e incubada a 37 °C por 15 minutos em microtubo tipo eppendorf (2,0 mL). Após o período de incubação, 0,5 mL de solução de formol salino tamponado, previamente aquecida a 37 °C foi adicionado, a fim de promover a fixação celular até análise posterior.

Foram avaliados 200 espermatozoides em aumento de 1000x com óleo de imersão em microscopia de contraste de fase (Olympus, modelo BX41), avaliando-se a presença de alterações na membrana plasmática que indicavam sua integridade funcional. Espermatozoides com membranas íntegras apresentaram alterações morfológicas características, com caudas dobradas ou enroladas, devido à entrada de água no citoplasma e consequente turgescência celular.

Em contrapartida, as células com membranas lesadas se apresentavam com a cauda estendida, sendo denominadas como não reativas. O princípio fundamental desse teste baseia-se no conceito de osmose, em que a água busca o equilíbrio entre duas concentrações de soluto distintas em ambos os lados da membrana. Em uma solução hiposmótica, se a membrana espermática estiver funcionalmente intacta, a água de maior concentração externa será absorvida ativamente para o interior do espermatozoide,

resultando em aumento característico no volume da cauda espermática (dobramento) (CHECK, CHECK e BOLLENDORF, 2023).

3.12 Teste Supravital

A viabilidade espermática foi determinada por meio do teste supravital, utilizando o corante para Avaliação Espermática (Eosina-Nigrosina). Esse teste permite diferenciar células viáveis de não viáveis relacionada a integridade da membrana plasmática, o método baseia-se na permeabilidade diferencial da eosina, que penetra apenas em espermatozoides com membranas comprometidas, resultando em coloração avermelhada do núcleo e permitindo a identificação de células inviáveis. Trata-se de uma técnica de rápida execução e fácil aplicação, não demandando microscopia especializada (KER, 2010).

Para a realização do teste, uma alíquota de 10 μ L de sêmen foi homogeneizada com 10 μ L do corante supravital em uma lâmina de microscopia aquecida a 37 °C. Imediatamente após, foi realizado um esfregaço fino e uniforme, que foi deixado para secagem em temperatura ambiente. Após a secagem, a lâmina foi analisada contando-se 100 células em aumento de 1000x por microscopia de luz (Olympus, modelo BX40). Espermatozoides viáveis, com membrana plasmática íntegra, apresentaram coloração incolor ou levemente rosada, indicando que a membrana celular foi capaz de impedir a penetração do corante.

Já os espermatozoides inviáveis, com membrana plasmática comprometida como citado anteriormente, apresentaram coloração vermelha devido à entrada do corante na célula. A integridade estrutural da membrana plasmática espermática pode ser eficientemente avaliada pelo teste supravital, que utiliza corantes fluorescentes derivados da eosina em combinação com a nigrosina como corante de fundo.

3.13 Análises Estatística

As análises estatísticas foram conduzidas utilizando os softwares R (v.3.5.1; R Core Team, 2018) e SAEG (v.9.1; Fundação Arthur Bernardes – UFV, Viçosa, Brasil), de acordo com a natureza dos dados e os objetivos específicos de cada etapa experimental. Inicialmente, foram calculadas estatísticas descritivas (média, desvio padrão e amplitude)

para todos os parâmetros avaliados. A comparação entre os grupos experimentais (sêmen fresco, liofilizado e criopreservado) foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) utilizando o modelo linear geral (GLM).

A normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias foram verificadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Quando os pressupostos foram atendidos, as médias foram comparadas pelo teste de Duncan ($p < 0,05$) para múltiplos contrastes, ou pelo teste de Dunnett, quando o objetivo foi comparar os tratamentos ao grupo controle (sêmen fresco). Para avaliar o efeito da idade sobre o volume do ejaculado, os animais foram categorizados em três faixas etárias (jovem, intermediário e maduro), e os dados submetidos à ANOVA seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$). Adicionalmente, coeficientes de correlação de Pearson foram calculados para avaliar associações lineares entre variáveis morfológicas e funcionais. O coeficiente de significância adotado em todas as análises foi de 5% ($p < 0,05$).

4 Resultados e Discussão

4.1 Sêmen Fresco

Os sêmens de todos os animais se mostram com coloração branco-marfim e consistência cremosa, com odor característico *sui generis*, dentro da normalidade, de acordo o que é preconizado pelo CBRA (2013). Os parâmetros seminais do sêmen fresco apresentaram variações entre as coletas e entre os animais, mesmo sob as mesmas condições ambientais e de manejo ($p < 0,05$), indicando a influência de fatores individuais (Tabela 4).

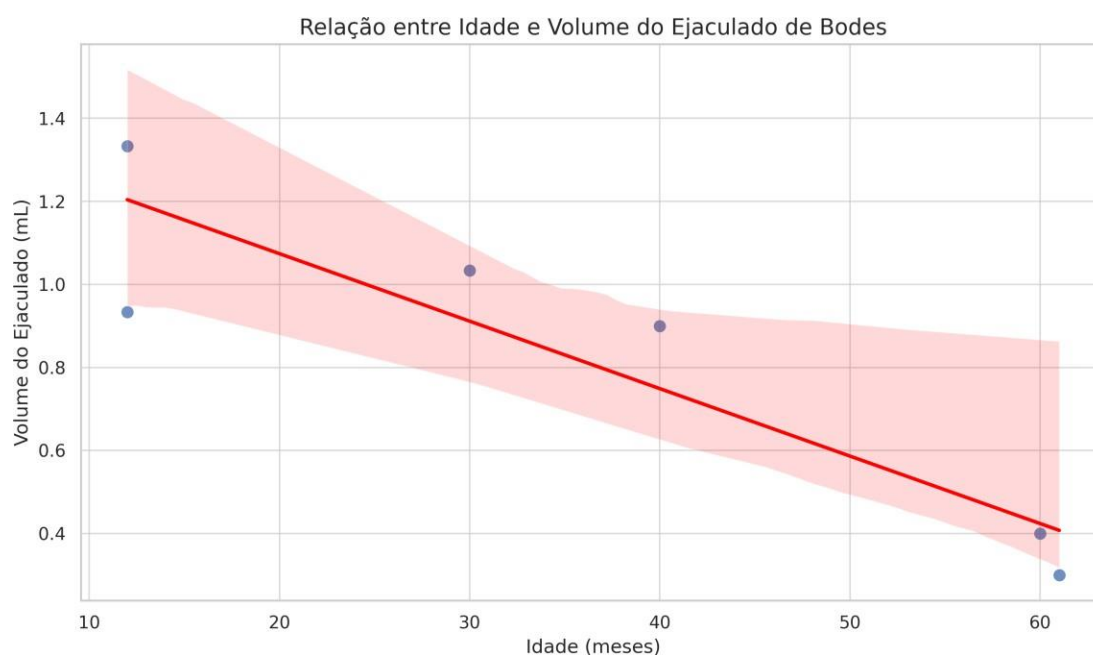
Tabela 4. Valores médios, desvio padrão e amplitude dos parâmetros analisados para o sêmen fresco.

Parâmetro	Média ± DP	Amplitude
Volume (mL)	0.87 ± 0.44	0.20 – 1.50
Turbilhonamento	3.67 ± 0.99	2.00 – 5.00
Motilidade (%)	88.89 ± 4.71	80.00 – 95.00
Vigor Espermático	4.67 ± 0.62	3.00 – 5.00

Concentração (sptz/mL)	2.59 ± 1.02	1.00 – 4.45
-------------------------------	--------------------	--------------------

Os valores observados indicam que os sêmens frescos apresentaram qualidade espermática elevada, com uniformidade nos parâmetros de motilidade e vigor. No entanto, foi detectada variação na concentração espermática, e no volume entre os indivíduos conforme ilustrado na Figura 1.

Figura 1. Valores médios do volume do ejaculado de bodes (n = 6), coletados durante o período experimental.



Legenda: Observa-se uma tendência de maior volume ejaculado em animais mais jovens, sugerindo que fatores etológicos e maturacionais associados à idade podem influenciar a emissão seminal. A linha de regressão linear indica uma relação negativa entre a idade e o volume do ejaculado.

A fim de investigar se essas diferenças apresentavam significância estatística, os animais foram agrupados em três categorias etárias: jovens (12 meses), intermediários (30–40 meses) e maduros (60–61 meses). Os dados obtidos para o volume ejaculado estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Volume dos ejaculados de bodes classificados por grupo etário

Grupo etário	Média (mL)	Desvio padrão	n	Erro padrão	Diferença estatística
Jovem	1.10	0.20	6	0.08	A

Intermediário	0.97	0.16	6	0.07	A
Maduro	0.37	0.12	6	0.05	B

Legenda: Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$), revelou que os bodes maduros apresentaram volume ejaculado inferior aos demais grupos ($p < 0,001$), enquanto não houve diferença entre os grupos jovem e intermediário ($p > 0,05$). Esta observação sugere que a capacidade secretória das glândulas acessórias se mantém preservada até a meia-idade, declinando apenas em idades mais avançadas. A redução observada nos indivíduos mais velhos pode estar associada tanto a fatores hormonais quanto à diminuição da libido, implicando em menor estímulo ejaculatório e menor volume seminal.

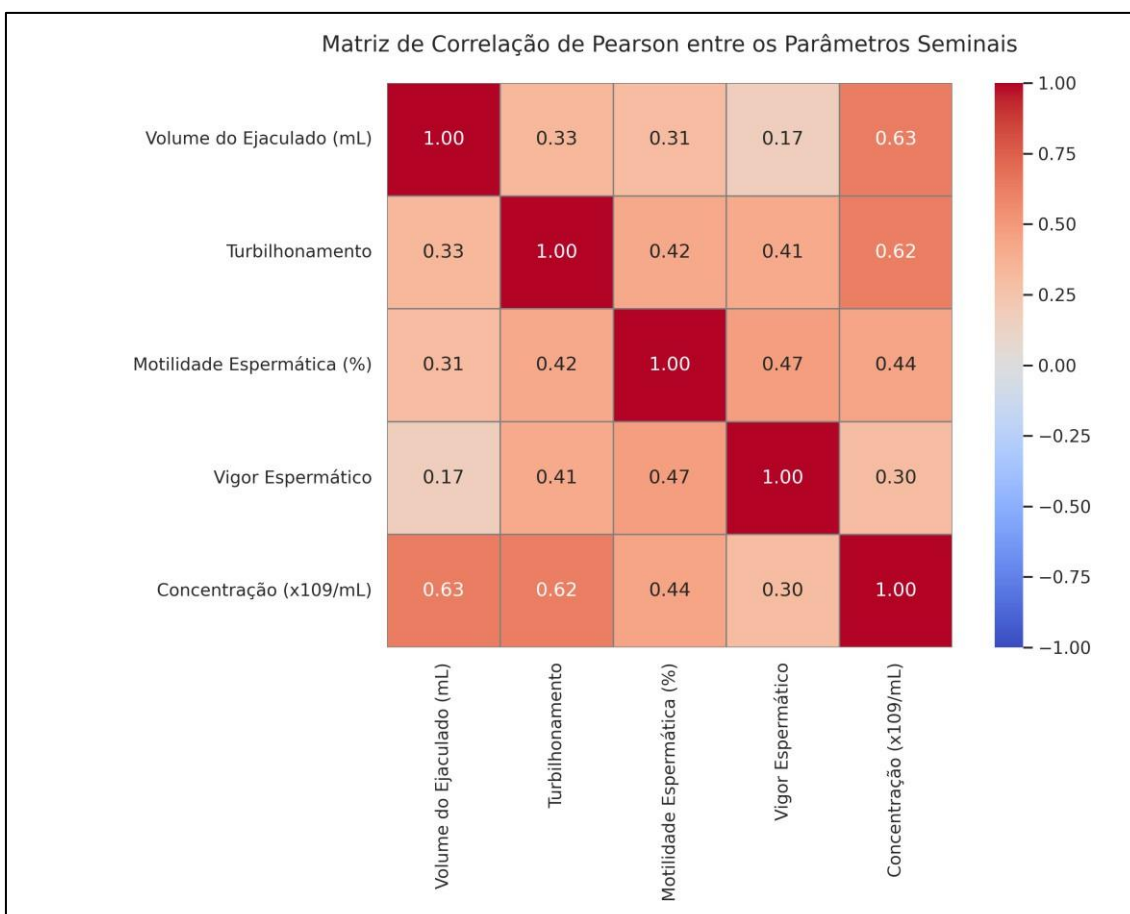
Em contraste com os resultados aqui obtidos, Al-Ghalban et al. (2004) avaliando bodes da raça Damascus, relataram maior desempenho seminal em adultos (2–4 anos) em comparação a animais mais jovens (10–12 meses), ainda que com variações discretas no volume. Essa divergência pode refletir diferenças raciais, ambientais ou de definição etária entre os estudos.

Nossos achados também contrastam com os de Pascal et al. (2024), os quais observaram menores volumes ejaculatórios em bodes jovens da raça Carpatina. No presente estudo, mesmo os animais classificados como jovens (12 meses) apresentaram desempenho seminal comparável ou superior ao dos indivíduos mais velhos, sugerindo maturidade funcional precoce. Essa observação é corroborada por Souza et al. (2011), que relataram puberdade por volta da 20ª semana em machos Anglo-Nubianos, com plena capacidade espermato gênica ainda no primeiro ano de vida.

Dessa forma, a idade mostrou-se um fator determinante sobre o volume do ejaculado, sendo relevante para programas de seleção e aplicação de biotecnologias, como a liofilização, que dependem da qualidade inicial do material seminal para alcançar melhores resultados pós-processamento.

A análise das correlações entre os parâmetros seminais está representada na Figura 2, que ilustra a matriz de correlação de Pearson entre as variáveis avaliadas.

Figura 2. Matriz de correlação de Pearson entre os parâmetros seminais à fresco. A análise demonstra as associações lineares entre volume do ejaculado, turbilhonamento, motilidade espermática, vigor espermático e concentração espermática.



Legenda: Observa-se correlação forte entre o volume do ejaculado e a concentração espermática ($r = 0,63$), bem como entre o turbilhonamento e a concentração ($r = 0,62$), as demais correlações variaram de fracas a moderadas.

Na avaliação dos parâmetros seminais, observou-se que o vigor espermático apresentou correlação moderada com a motilidade espermática, divergindo dos achados previamente reportados na literatura para sêmen fresco de touros (MARTINEZ et al., 2000; RONDA et al., 2019) e sêmen congelado de caprinos (OLIVEIRA, 2013), nos quais foi descrita correlação forte ou muito forte entre essas variáveis. Essa discrepância pode ser atribuída à baixa variabilidade entre os ejaculados analisados para estes dois parâmetros.

O turbilhonamento mostrou correlação alta com a concentração espermática ($r = 0,6$), sugerindo que ejaculados com maior densidade espermática apresentam escore para turbilhonamento alto. O volume ejaculado apresentou correlação alta com a

concentração espermática ($r = 0,6$), indicando que ejaculados de maior volume tenderam a conter maior número de espermatozoides por mililitro.

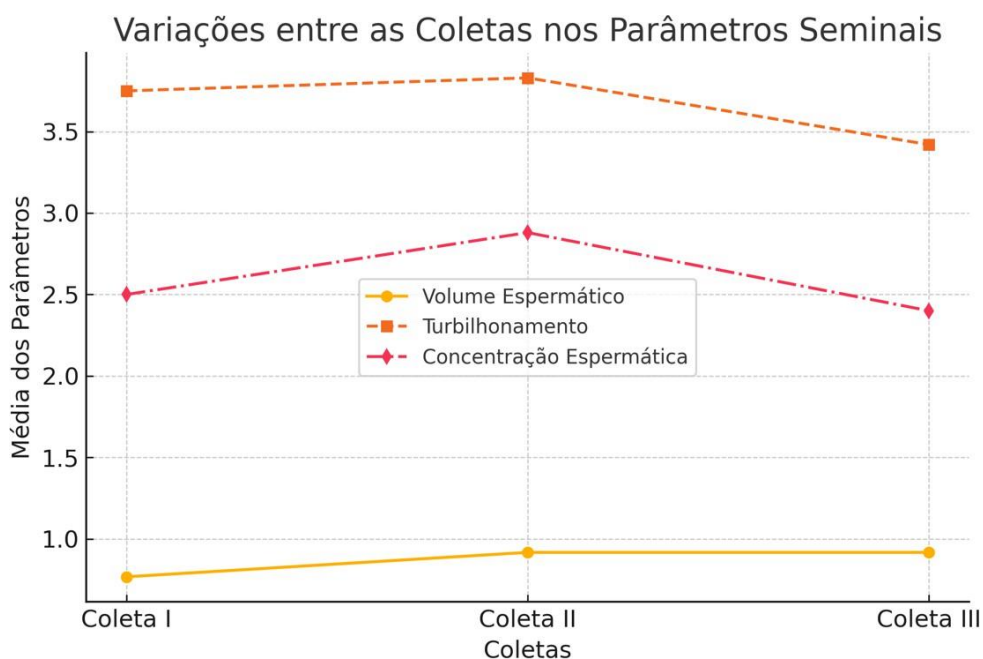
Esse achado sugere que o aumento no volume não refletiu diluição da amostra, mas sim um incremento proporcional na produção espermática, possivelmente associado a maior atividade espermatogênica ou secreção epididimária. Observou-se que os menores volumes foram predominantes em animais de idade mais avançada, o que sugere uma possível influência da senescência reprodutiva sobre os parâmetros seminais.

Os animais jovens e de meia-idade apresentaram, em geral, maiores volumes e concentrações espermáticas, o que pode ter contribuído para a correlação observada. Essa hipótese é respaldada por evidências consolidadas na literatura, que indicam um declínio progressivo da qualidade seminal com o avanço da idade, incluindo reduções nos volumes ejaculatórios e concentração (WINKLE et al., 2009; KIPPER et al., 2017).

Diferentemente, embora a presente investigação tenha identificado uma correlação positiva entre volume e concentração espermática, a literatura relata predominantemente correlações negativas entre essas variáveis. Filipčík et al. (2023), por exemplo, ao avaliarem touros da raça Fleckvieh–Simmental, relataram correlação negativa, embora fraca, entre essas características ($r = - 0,12$).

Houve variação entre os dias de coleta nos diferentes parâmetros seminais analisados, conforme ilustrado na Figura 3. O volume do ejaculado apresentou incremento da coleta I para a coleta III. O turbilhonamento espermático foi reduzido na coleta III em comparação à coleta I.

Figura 3. Variações nos parâmetros seminais à fresco entre coletas.



Legenda: A figura apresenta as médias dos valores de volume espermático, turbilhonamento e concentração espermática obtidas nas coletas I, II e III para o sêmen fresco.

A concentração espermática por mililitro apresentou aumento entre a coleta I e II, com posterior estabilização na coleta III. Essas variações podem estar relacionadas ao progressivo condicionamento dos machos ao manejo experimental e à exposição visual e olfativa às fêmeas em estro, particularmente entre a primeira e a segunda coleta. Na terceira coleta, presumivelmente, o estímulo comportamental adicional tornou-se limitado, resultando em menor resposta fisiológica. Acredita-se que tais estímulos tenham influenciado o aumento do volume do ejaculado por meio da elevação do volume de plasma seminal, o que, conseqüentemente, reduziu a concentração de espermatozoides por mililitro.

Os parâmetros de motilidade e vigor espermático apresentaram baixa variação entre os dias de coleta, sugerindo estabilidade desses indicadores de qualidade seminal ao longo do período avaliado. Ambos demonstraram correlação fraca com o volume ejaculado ($r = 0,3$ e $r = 0,1$, respectivamente), e correlação moderada com o turbilhonamento ($r = 0,4$ para ambos). Em relação à concentração espermática, a motilidade apresentou correlação moderada ($r = 0,4$), enquanto o vigor apresentou correlação fraca ($r = 0,3$), indicando que tais características funcionais possuem associação limitada com os parâmetros físicos avaliados.

Os resultados obtidos confirmam que, apesar do ambiente controlado e das mesmas condições de manejo, há diferenças individuais na qualidade seminal dos bodes estudados. As análises reforçam a importância de considerar fatores individuais ao avaliar a viabilidade reprodutiva, bem como na seleção de reprodutores para programas de melhoramento genético. Estudos futuros podem contribuir para elucidar as causas das variações observadas, considerando aspectos genéticos, fatores de manejo como a frequência de coleta, características gonadais relacionadas à reserva extragonádica e à produção por grama de tecido testicular, além de fatores nutricionais que influenciam diretamente a espermatogênese e a qualidade seminal.

4.2 Sêmen Fresco, Liofilizado e Criopreservado

A qualidade espermática observada nos grupos experimentalmente tratados com criopreservação e liofilização apresentou redução significativa em diversos parâmetros quando comparada ao sêmen fresco (Tabela 6).

Tabela 6. Dados das diferentes variáveis submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Duncan e Dunnett (>5%).

TRAT	MOT	VIG	SV	HOST	DEFM	DEFMEN	DEFT
SF	88,33 A	4,67 A	77,33 A	68,00 A	3,83 B	3,33 A	7,17 B
LT1	0,00 D*	0,00 D*	12,39 B*	11,72 B*	7,33 A*	3,72 A	11,22 A*
LT2	0,00 D*	0,00 D*	11,89 B*	8,83 B*	6,50 A*	3,67 A	10,17 A*
LT3	0,00 D*	0,00 D*	6,50 B*	10,33 B*	7,22 A*	3,44 A	10,78 A*
CT1	14,44 B*	1,25 B*	12,39 B*	10,67 B*	6,83 A*	3,28 A	10,11 A*
		0,89					
CT2	7,22 C*	BC*	10,78 B*	7,89 B*	7,67 A*	3,72 A	11,39 A*
CT3	3,61 D*	0,75 C*	9,06 B*	7,33 B*	6,83 A*	3,28 A	10,11 A*

¹Legendas: TRAT (tratamento): SF – sêmen fresco, LT1 – sêmen liofilizado T1, LT2 sêmen liofilizado T2, LT3 - sêmen liofilizado T3, CT1 - sêmen criopreservado T1, CT2 - sêmen criopreservado T2, CT3 - sêmen criopreservado T3; MOT (motilidade espermática), VIG (vigor espermático), SV (teste supravital), HOST (teste hiposmótico), DEFM (defeitos espermáticos maiores), DEFMEN (defeitos espermáticos menores, DEFT (defeitos espermáticos totais).

²Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

³Médias seguidas por asterisco na mesma coluna diferem do controle (SF) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

A motilidade espermática inicial do sêmen fresco foi de 88,33%, com vigor médio de 4,67, ambos superiores aos valores mínimos recomendados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), que estabelece como referência motilidade $\geq 80\%$ e vigor ≥ 3 para sêmen caprino fresco. Já nos grupos criopreservados (CT1, CT2, CT3), observou-se queda acentuada da motilidade para 14,44%, 7,22% e 3,61%,

respectivamente. Esses valores estão muito abaixo do padrão mínimo de 30% para sêmen congelado, reforçando a gravidade da perda funcional observada.

Essa redução extrema, principalmente nos grupos CT2 e CT3, supera os valores frequentemente reportados na literatura para sêmen caprino pós-descongelamento, como os descritos por Li et al. (2025), que relataram uma queda de 80% para 53,10% (-34,87%), e por Aboel-Hassan, Abu Elnaga e Ghanem (2024), que descreveram redução de 72,48% para 46,96% (-35,22%). A diferença entre os valores observados e os esperados sugere a influência de fatores limitantes adicionais no protocolo experimental utilizado.

Hipotetiza-se que o tempo total de processamento das amostras, desde a coleta até o armazenamento final, tenha sido excessivamente prolongado e biologicamente agressivo à qualidade espermática. Durante esse intervalo, múltiplas etapas operacionais incluindo coleta, avaliação, diluição, alocação em criotubos, fixação nos suportes, congelamento programado, armazenamento, centrifugação e lavagem podem ter gerado estresse cumulativo sobre as células, especialmente devido à manipulação térmica e mecânica constante.

Esse fator pode também explicar a discrepância entre os resultados obtidos neste experimento e aqueles observados no estudo piloto, em que os criotubos apresentaram desempenho superior. A escala reduzida e a menor duração do processamento naquele contexto provavelmente minimizaram os efeitos deletérios cumulativos, o que não se repetiu na aplicação em larga escala adotada na presente etapa.

A motilidade e o vigor espermático foram drasticamente comprometidos nos grupos liofilizados (LT1, LT2, LT3), sendo ambos nulos (0,00). Tal achado é consistente com estudos clássicos, como os de Wakayama e Yanagimachi (1998) e Keskintepe et al. (2002), que reportaram perda total da motilidade após liofilização. Bossi (2016) também confirmou, por meio de microscopia eletrônica, danos severos à membrana plasmática, mitocôndrias e estruturas flagelares, incluindo o axonema, elementos diretamente responsáveis pela manutenção da cinética espermática.

Em linha com esses achados, Phavaphutanon et al. (2024) demonstraram, em estudo com sêmen canino, que a liofilização induz perda completa de motilidade e viabilidade, com danos acentuados à cauda e ao flagelo, inviabilizando o uso para inseminação

artificial. Ainda assim, o DNA espermático preservado sob refrigeração (4 °C) mostrou-se compatível com técnicas de ICSI. Esses dados reforçam que, embora a liofilização comprometa a cinética espermática, o potencial genético pode ser parcialmente preservado sob condições adequadas.

O sêmen fresco apresentou baixos índices de defeitos espermáticos totais (DEFT = 7,17%), bem abaixo do limite de 20% estabelecido pelo CBRA (2013). Já os grupos tratados, tanto liofilizados quanto criopreservados, mostraram aumentos significativos: LT1 (11,22%), LT2 (10,17%), LT3 (10,78%), CT1 (10,11%), CT2 (11,39%) e CT3 (10,11%). Tais valores indicam incrementos entre 41 e 58%, em linha com o relato de Barbas (2023), que observou aumento médio de 54,5% na morfologia anormal pós-congelamento. Notavelmente, os grupos contendo trealose (LT2, LT3, CT2, CT3) apresentaram leve tendência à menor DEFT, ainda que sem significância estatística, o que pode justificar futuras investigações sobre seu potencial efeito protetor estrutural, como já sugerido por Shahmoradi et al. (2022).

No presente estudo, nenhum dos grupos liofilizados ou criopreservados diferiu estatisticamente do sêmen fresco quanto aos defeitos menores (DEFMEN). Os valores observados permaneceram em faixa estreita, variando entre 3,28 e 3,72%, o que demonstra relativa preservação dessa característica morfológica em todos os tratamentos. O grupo CT2, por exemplo, apresentou DEFMEN de 3,72%, valor inferior ao relatado por Bittencourt et al. (2006) para sêmen caprino congelado com equilíbrio ideal (G2 = 6,71%). A manutenção da integridade morfológica fina, mesmo em condições adversas de processamento, reforça a hipótese de que certos aspectos estruturais espermáticos são menos sensíveis aos danos da criopreservação e da liofilização.

A viabilidade celular avaliada pelo teste supravital (SV) reforçou a superioridade do sêmen fresco (77,33%), seguido pelos grupos LT1 (12,39%), LT2 (11,89%), CT1 (12,39%) e CT2 (10,78%), sem diferenças significativas entre eles. A integridade da membrana plasmática avaliada pelo teste hiposmótico (HOST) apresentou padrão semelhante. Curiosamente, os grupos liofilizados LT1 e LT2 superaram os CT2 e CT3 nesses testes, sugerindo que, apesar da ausência total de motilidade, aspectos funcionais celulares podem ser mais preservados sob certas condições de liofilização do que na criopreservação mal conduzida. Os valores observados em ambos os testes para os grupos

criopreservados foram inferiores aos de Iqbal et al. (2015) e Dias et al. (2015), mas compatíveis com os intervalos de Castilho et al. (2009), que variaram de 2,1% a 23,5%.

Ainda que os dados indiquem perdas funcionais expressivas, especialmente na motilidade, é importante considerar a literatura sobre uso de sêmen liofilizado via ICSI. Estudos como os de Wakayama e Yanagimachi (1998), Wakayama et al. (2021) e Men et al. (2013) demonstram que espermatozoides fisiologicamente mortos podem promover desenvolvimento embrionário completo, desde que o conteúdo nuclear esteja preservado. Palazzese et al. (2018) demonstraram esse potencial também em ovinos — espécie filogeneticamente próxima aos caprinos, reforçando a viabilidade do uso futuro da técnica na espécie.

Estudos recentes também evidenciam que o tipo de armazenamento pós-liofilização pode influenciar diretamente na preservação do DNA espermático. Phavaphutanon et al. (2024) observaram menor índice de fragmentação em amostras armazenadas a 4 °C em comparação à temperatura ambiente, o que reforça a importância de variáveis ambientais no desempenho final da técnica.

O uso de trealose como excipiente apresentou tendência de proteção em alguns parâmetros, como DEFT, HOST e SV, mas não mostrou eficácia sobre a motilidade ou vigor espermático, corroborando Shahmoradi et al. (2022), que apontaram a trealose como estabilizante estrutural, embora sem impedir a perda de cinética.

5 Conclusão

A liofilização do sêmen caprino resultou na perda total de motilidade e vigor espermático, porém preservou parâmetros estruturais como morfologia, integridade de membrana e viabilidade celular em níveis semelhantes aos observados na criopreservação. A criopreservação, por sua vez, apresentou motilidade inferior ao esperado, sugerindo que o protocolo adotado, especialmente quanto ao tempo de processamento, pode ter impactado negativamente a qualidade espermática. Nenhum dos grupos liofilizados ou criopreservados diferiu estatisticamente do sêmen fresco quanto aos defeitos menores, indicando que, sob determinadas condições, características morfológicas podem ser preservadas mesmo após procedimentos de conservação intensivos. A adição de trealose não evitou a perda da motilidade, mas apresentou tendência positiva na preservação

estrutural, especialmente entre os grupos liofilizados. Os dados obtidos indicam que, embora a liofilização ainda não seja viável para uso em inseminação artificial convencional, ela apresenta potencial para aplicação em técnicas como a ICSI, desde que associada a protocolos otimizados. Recomenda-se a continuidade dos estudos com foco na redução do tempo de manipulação, no aprimoramento das formulações diluidoras e na avaliação funcional do sêmen reidratado, incluindo testes de fertilidade in vivo.

6 Referências Bibliográficas

ABDALLA, H.; HIRABAYASHI, M.; HOCHI, S. The ability of freeze-dried bull spermatozoa to induce calcium oscillations and resumption of meiosis. **Theriogenology**, v. 71, n. 3, p. 543-552, 2009.

ACKER, J.P. et al. Intracellular ice formation is affected by cell interactions. **Cryobiology**, v. 38, n. 4, p. 363-371, 1999.

ALBRIGHT, J.L.; ERB, R.E.; EHLERS, M.H. Freeze-drying bovine spermatozoa. **Journal of Dairy Science**, v. 41, p. 206, 1958.

ALDANA, A. et al. Discrete dynamic model of the mammalian sperm acrosome reaction: the influence of acrosomal pH and physiological heterogeneity. **Frontiers in Physiology**, v. 12, p. 682790, 2021.

ANDERSON, J.M.; HAND, S.C. Transgenic expression of late embryogenesis abundant proteins improves tolerance to water stress in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Experimental Biology**, v. 224, n. 4, p. 1-10, 2021.

ANZALONE, D.A. et al. Freeze-dried spermatozoa: An alternative biobanking option for endangered species. **Animal Reproduction Science**, v. 190, p. 85-93, 2018.

ARAKAWA, T.; TIMASHEFF, S.N. Preferential interactions of proteins with salts in concentrated solutions. **Biochemistry**, v. 21, n. 25, p. 6545-6552, 1982.

ARINHO, W.A.S. et al. Seminal characteristics and sperm membrane bulls supplemented with tocopherol. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 17, p. 322-330, 2016.

BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 1, p. 1-7, 2000.

BAILEY, J.; MORRIER, A.; CORMIER, N. Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 83, n. 3, p. 393-401, 2003.

BAUST, J.G.; GAO, D.; BAUST, J.M. Cryopreservation: An emerging paradigm change. **Organogenesis**, v. 5, n. 3, p. 90-96, 2009.

BELOTT, C.; JANIS, B.; MENZE, M. A. Liquid-liquid phase separation promotes animal desiccation tolerance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 44, p. 27676-27684, 2020.

BEST, B.P. Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. **Rejuvenation Research**, v. 18, n. 5, p. 422-436, 2015.

BIANCHI, E.; WRIGHT, G. J. Sperm meets egg: the genetics of mammalian fertilization. **Annual Review of Genetics**, v. 50, n. 1, p. 93-111, 2016.

BIELANSKI, A. et al. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. **Cryobiology**, v. 46, n. 2, p. 146-152, 2003.

BILLY, D.; POTTS, M. Life and death of dry prokaryotes. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 1, p. 7-12, 2001.

BLOM, E. Pathological conditions in the genital organs and in the semen of group for rejection of breeding bulls for import or export to and from Denmark, 1958-1982. **Nordisk Veterinaermedicin**, v.35, n.3, p.105-130, 1983.

BRITO, L.F.C. et al. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**, v. 60, n. 8, p. 1539-1551, 2003.

CABRAL, M.A. Avaliação ultraestrutural e funcional do espermatozoide humano submetido ao processo de liofilização. 2017. 81 p. Tese (Pós Graduação em Saúde da

Mulher) – **Universidade Federal de Minas Gerais**, Faculdade de Medicina, Belo Horizonte, 2017. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1843/BUBD-AX8KEL>. Acesso em: 27 fev. 2025.

CASTILHO, E.F. et al. Use of propolis and ascorbic acid on goat semen cryopreservation. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 2335-2345, 2009.

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3. ed.** CBRA. Belo Horizonte-MG, p. 47-50, 2013.

CHAPLIN, M.F. Water: its importance to life. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 29, n. 2, p. 54-59, 2001.

CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 59, n. 4, p. 451-458, 2001.

CHECK, J.H.; CHECK, D.L.; BOLLENDORF, A. Hypo-osmotic swelling test and male factor. **Reproductive Medicine**, v. 4, n. 2, p. 118-132, 2023.

CHOI, Y.H. et al. Production of live foals via intracytoplasmic injection of lyophilized sperm and sperm extract in the horse. **Reproduction**, v. 142, n. 4, p. 529, 2011.

CLARK, G.F. A role for carbohydrate recognition in mammalian sperm-egg binding. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 450, n. 3, p. 1195-1203, 2014.

CROWE, J.H.; CARPENTER, J. F.; CROWE, L. M. The role of vitrification in anhydrobiosis. **Annual Review of Physiology**, v. 60, n. 1, p. 73-103, 1998.

CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CHAPMAN, D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. **Science**, v. 223, n. 4637, p. 701-703, 1984.

CROWE, J.H.; HOEKSTRA, F.A.; CROWE, L.M. Anhydrobiosis. **Annual Review of Physiology**, v. 54, n. 1, p. 579-599, 1992.

CROWE, J.H. et al. Anhydrobiosis: cellular adaptation to extreme dehydration. **Comprehensive Physiology**, p. 1445-1477, 1997.

CROWE, J.H. et al. Stabilization of dry mammalian cells: lessons from nature. **Integrative and Comparative Biology**, v. 45, n. 5, p. 810-820, 2005.

CROWE, J.H. et al. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. **Biochemical Journal**, v. 242, n. 1, p. 1, 1987.

CROWE, L.M. et al. Prevention of fusion and leakage in freeze-dried liposomes by carbohydrates. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 861, p. 131-140, 1986.

CZERNIK, M. et al. Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins confer water stress tolerance to mammalian somatic cells. **Cryobiology**, v. 92, p. 189-196, 2020.

DE ARRUDA, R.P. et al. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. **1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**, p. 166-179, 2005.

DE ARRUDA, R.P. et al. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, p. 47-60, 2015.

DIAS, J.C.O. et al. Characteristics of thawed goat semen after addition of ringer lactate, sodium citrate and tris solution. **Ciência Animal Brasileira**, v. 16, p. 243-250, 2015.

EDDY, E.M. The scaffold role of the fibrous sheath. **Society of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 65, p. 45-62, 2007.

EDDY, E.M.; TOSHIMORI, K.; O'BRIEN, D.A. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. **Microscopy Research and Technique**, v. 61, n. 1, p. 103-115, 2003.

FAN, J. et al. Optimization study on the rehydration process of lyophilized human platelets. **Chinese Science Bulletin**, v. 56, p. 455-460, 2011.

FLESCHE, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes**, v. 1469, n. 3, p. 197-235, 2000.

FLORMAN, H.M.; JUNGnickel, M.K.; SUTTON, K.A et al. Regulating the acrosome reaction. **International Journal of Developmental Biology**, v. 52, n. 5-6, p. 503-510, 2008.

GADELLA, B.M.; BOERKE, A. An update on post-ejaculatory remodeling of the sperm surface before mammalian fertilization. **Theriogenology**, v. 85, n. 1, p. 113-124, 2016.

GAO, D.; CRITSER, J. Mechanisms of cryoinjury in living cells. **ILAR journal**, v. 41, n. 4, p. 187-196, 2000.

GARCÍA, A. et al. Effect of different disaccharides on the integrity and fertilising ability of freeze-dried boar spermatozoa: a preliminary study. **CryoLetters**, v. 35, n. 4, p. 277-285, 2014.

GIANAROLI, L. et al. A integridade do DNA é mantida após a liofilização de espermatozoides humanos. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 5, p. 1067-1073. e1, 2012.

GILMORE, J.A. et al. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. **Human Reproduction**, v. 15, n. 2, p. 335-343, 2000.

GOYAL, K. et al. Molecular anhydrobiology: identifying molecules implicated in invertebrate anhydrobiosis. **Integrative and Comparative Biology**, v. 45, n. 5, p. 702-709, 2005.

GRÖTTER, L.G. et al. Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 4, p. 655-665, 2019.

GUZICK, D.S. et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. **New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 19, p. 1388-1393, 2001.

HARA, H. et al. 60 Effect of cake collapse on the integrity of freeze-dried bull spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 1, p. 144-144, 2013.

HARA, H. et al. Adverse effect of cake collapse on the functional integrity of freeze-dried bull spermatozoa. **Cryobiology**, v. 68, n. 3, p. 354-360, 2014.

HARA, H. et al. Procedure for bovine ICSI, not sperm freeze-drying, impairs the function of the microtubule-organizing center. **Journal of Reproduction and Development**, v. 57, n. 3, p. 428-432, 2011.

HAYS, L.M. et al. Factors affecting leakage of trapped solutes from phospholipid vesicles during thermotropic phase transitions. **Cryobiology**, v. 42, n. 2, p. 88-102, 2001.

HERRERA-BARRAGÁN, J.A. et al. Characterization and seminal cryopreservation of three species of birds of prey. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 25, n. 1, p. 69, 2024.

HIRABAYASHI, M. et al. Viable rat offspring derived from oocytes intracytoplasmically injected with freeze-dried sperm heads. **Zygote**, v. 13, n. 1, p. 79-85, 2005.

HOANG-THI, A. et al. The impact of high ambient temperature on human sperm parameters: a meta-analysis. **Iranian Journal of Public Health**, v. 51, n. 4, p. 710, 2022.

HOCHI, S. et al. Challenging endeavour for preservation of freeze-dried mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Development**, v. 57, n. 5, p. 557-563, 2011.

HOCHI, S. et al. Live rats resulting from injection of oocytes with spermatozoa freeze-dried and stored for one year. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 75, n. 5, p. 890-894, 2008.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 47-58, 2000.

INOUE, N. et al. Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 50, p. 20008-20011, 2011.

IQBAL, Z. et al. Effect of Butylated Hydroxytoluene on Post-thawed Semen Quality of Beetal Goat Buck *Capra hircus*. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 47, n. 1, 2015.

ITO, D. et al. Effect of trehalose on the preservation of freeze-dried mice spermatozoa at room temperature. **Journal of Reproduction and Development**, v. 65, n. 4, p. 353-359, 2019.

ITO, D. et al. Mailing viable mouse freeze-dried spermatozoa on postcards. **Isience**, v. 24, n. 8, 2021.

JANG, T.H. et al. Cryopreservation and its clinical applications. **Integrative Medicine Research**, v. 6, n. 1, p. 12-18, 2017.

JENNINGS, T.A. **Lyophilization: introduction and basic principles**. CRC press, 1999.

JEYENDRAN, R.S.; GRAHAM, E. F.; SCHMEHL, M. K. L. Fertility of dehydrated bull semen. **Cryobiology**, v. 18, n. 3, p. 292-300, 1981.

WAKAYAMA, T.; YANAGIMACHI, R. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. **Nature Biotechnology**, v. 16, n. 7, p. 639-641, 1998.

JIN, M. et al. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 12, p. 4892-4896, 2011.

JUNGNICKEL, M. et al. Phosphoinositide-dependent pathways in mouse sperm are regulated by egg ZP3 and drive the acrosome reaction. **Developmental Biology**, v. 304, n. 1, p. 116-126, 2007.

KANEKO, T. et al. Tolerance of the mouse sperm nuclei to freeze-drying depends on their disulfide status. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 6, p. 1859-1862, 2003.

KANEKO, T. Simple sperm preservation by freeze-drying for conserving animal strains. **Chromosomal Mutagenesis**, p. 317-329, 2015.

KANEKO, T.; KIMURA, S.; NAKAGATA, N. Importance of primary culture conditions for the development of rat ICSI embryos and long-term preservation of freeze-dried sperm. **Cryobiology**, v. 58, n. 3, p. 293-297, 2009.

KANEKO, T.; NAKAGATA, N. Improvement in the long-term stability of freeze-dried mouse spermatozoa by adding of a chelating agent. **Cryobiology**, v. 53, n. 2, p. 279-282, 2006.

KANEKO, T.; NAKAGATA, N. Relation between storage temperature and fertilizing ability of freeze-dried mouse spermatozoa. **Comparative Medicine**, v. 55, n. 2, p. 140-144, 2005.

KANEKO, T.; SERIKAWA, T. Long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa. **Cryobiology**, v. 64, n. 3, p. 211-214, 2012.

KANEKO, T.; SERIKAWA, T. Successful long-term preservation of rat sperm by freeze-drying. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35043, 2012.

KANEKO, T.; NAKAGATA, N. Improvement in the long-term stability of freeze-dried mouse spermatozoa by adding of a chelating agent. **Cryobiology**, v. 53, n. 2, p. 279-282, 2006.

KARTOGLU, U.H.; MOORE, K.L.; LLOYD, J.S. Logistical challenges for potential SARS-CoV-2 vaccine and a call to research institutions, developers and manufacturers. **Vaccine**, v. 38, n. 34, p. 5393, 2020.

KAWASE, Y. et al. Effect of pressure at primary drying of freeze-drying mouse sperm reproduction ability and preservation potential. **Reproduction**, v. 133, n. 4, p. 841-846, 2007.

KAWASE, Y. et al. Possibility of long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 72, n. 3, p. 568-573, 2005.

KAWASE, Y.; SUZUKI, H. A study on freeze-drying as a method of preserving mouse sperm. **Journal of Reproduction and Development**, v. 57, n. 2, p. 176-182, 2011.

KAWASE, Y.; WADA, N. A.; JISHAGE, K. Evaluation of DNA fragmentation of freeze-dried mouse sperm using a modified sperm chromatin structure assay. **Theriogenology**, v. 72, n. 8, p. 1047-1053, 2009.

KELLER, A.; KERNS, K. Sperm capacitation as a predictor of boar fertility. **Molecular reproduction and development**, v. 90, n. 7, p. 594-600, 2023.

KER, P.G. **Fertilidade do sêmen congelado de jumento da raça Pêga em éguas inseminadas antes e após a detecção da ovulação**. 2010. Tese de Doutorado. Dissertação de Mestrado em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 81p.

KESKINTEPE, L. et al. Bovine blastocyst development from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 2, p. 409-415, 2002.

KUMAR, A. et al. Strategies to minimize various stress-related freeze-thaw damages during conventional cryopreservation of mammalian spermatozoa. **Biopreservation and Biobanking**, v. 17, n. 6, p. 603-612, 2019.

KUMAR, N.; SINGH, A.K.; CHOUDHARI, A.R. Impact of age on semen parameters in male partners of infertile couples in a rural tertiary care center of central India: a cross-sectional study. **International Journal of Reproductive BioMedicine**, v. 15, n. 8, p. 497, 2017.

KUSAKABE, H. et al. Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 24, p. 13501-13506, 2001.

KUSAKABE, H. Production of mouse fetuses using spermatozoa exposed temporarily to high temperature or continuously to room temperature after freeze-drying in Na⁺-free/K⁺-rich EGTA buffer. **Cryobiology**, v. 87, p. 105-109, 2019.

KUSAKABE, H.; TATENO, H. Characterization of chromosomal damage accumulated in freeze-dried mouse spermatozoa preserved under ambient and heat stress conditions. **Mutagenesis**, v. 26, n. 3, p. 447-453, 2011.

KUSAKABE, H.; YANAGIMACHI, R.; KAMIGUCHI, Y. Mouse and human spermatozoa can be freeze-dried without damaging their chromosomes. **Human Reproduction**, v. 23, n. 2, p. 233-239, 2008.

KWON, I.K.; PARK, K.E.; NIWA, K. Activation, pronuclear formation, and development in vitro of pig oocytes following intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 5, p. 1430-1436, 2004.

LEHTI, M.S.; SIRONEN, A. Formation and function of sperm tail structures in association with sperm motility defects. **Biology of Reproduction**, v. 97, n. 4, p. 522-536, 2017.

LESLIE, S.B. et al. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 10, p. 3592-3597, 1995.

LESLIE, S.B. et al. Trehalose lowers membrane phase transitions in dry yeast cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1192, n. 1, p. 7-13, 1994.

LIU, J.L. et al. Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 6, p. 1776-1781, 2004.

LÔBO, A.M.B.G. et al. **BGCON - Banco de Germoplasma de Caprinos e Ovinos Naturalizados: uma Alternativa para Inventariar a Infraestrutura dos Recursos Genéticos Existentes**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2007. (Comunicado Técnico, 85). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/526505/1/cot85.pdf>. Acesso em: 11 mar. 2025.

LOI, P. et al. Dry storage of mammalian spermatozoa and cells: state-of-the-art and possible future directions. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 33, n. 2, p. 82-90, 2021.

LOVE, C.C. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 547-557, 2011.

LV, C. et al. Spermatozoa cryopreservation: State of art and future in small ruminants. **Biopreservation and Biobanking**, v. 17, n. 2, p. 171-182, 2019.

MAGNOTTI, C. et al. Cryopreservation and vitrification of fish semen: a review with special emphasis on marine species. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, n. 1, p. 15-25, 2018.

MAIA, M.S. **Tecnologia do sêmen e inseminação artificial em caprinos e ovinos**. Revisado por Maria de Fátima Pinto Barreto. Natal: EMPARN, 2010. (Circuito de Tecnologias Adaptadas para a Agricultura Familiar, v. 13). Disponível em: <http://adcon.rn.gov.br/ACERVO/EMPARN/DOC/DOC000000000206052.PDF>. Acesso em: 08 fev. 2025.

MARTINS, C.F. et al. Effects of freeze-drying on cytology, ultrastructure, DNA fragmentation, and fertilizing ability of bovine sperm. **Theriogenology**, v. 67, n. 8, p. 1307-1315, 2007.

MARTINS, C.F. et al. The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n. 1, p. 94-104, 2007.

MARTINS, L.F. et al. Avaliação de diferentes osmolaridades de soluções hiposmóticas e tempos de incubação no teste hiposmótico do sêmen de touros Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 1519-1525, 2011.

MARTINS, C.F. et al. **Conservação de espermatozóides bovinos por liofilização (freeze-drying)**. 2008.

MATSUKAWA, K. Wagyu calf born after conception with freeze-dried semen in Japan. **Kyodo News**, Apr 18, 2020. Available in: <https://english.kyodonews.net/news/2020/04/61b68b6dbd2a-wagyu-calf-born-after-conception-with-freeze-dried-semen-in-japan.html>. Access in: 08 fev. 2025.

MAZUR, P. Principles of cryobiology. **Life in the frozen state**, p. 29-92, 2004. MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American journal of physiology-cell physiology**, v. 247, n. 3, p. C125-C142, 1984.

MEN, N.T. et al. Efeito da trealose na integridade do DNA de espermatozóides de javali liofilizado, fertilização e desenvolvimento embrionário após injeção intracitoplasmática de espermatozóides. **Theriogenology**, v. 80, n. 9, p. 1033-1044, 2013.

MENG, X. et al. Efeito da trealose sobre os espermatozóides suínos liofilizados. **Sheng wu Gong Cheng xue bao = Chinese Journal of Biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 1143-1149, 2010.

MERYMAN, H.T. Drying of living mammalian cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 85, n. 2, p. 729-734, 1960.

MILLER, D.; BRINKWORTH, M.; ILES, D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. **Reproduction**, v. 139, n. 2, p. 287-301, 2010.

MOISAN, A.E. et al. Embryonic development of felid oocytes injected with freeze-dried or air-dried spermatozoa. **Cryobiology**, v. 51, p. 373, 2005.

MONTES-GARRIDO, R. et al. Does size Matter? Testicular volume and its predictive ability of sperm production in rams. **Animals**, v. 13, n. 20, p. 3204, 2023.

MOSTEK, A. et al. Bull sperm capacitation is accompanied by redox modifications of proteins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 15, p. 7903, 2021.

MUNETO, T.; HORIUCHI, T. Full-term development of hamster embryos produced by injecting freeze-dried spermatozoa into oocytes. **Journal of Mammalian Ova Research**, v. 28, n. 1, p. 32-39, 2011.

NAKAI, M. et al. Effects of chelating agents during freeze-drying of boar spermatozoa on DNA fragmentation and on developmental ability in vitro and in vivo after intracytoplasmic sperm head injection. **Zygote**, v. 15, n. 1, p. 15-24, 2007.

OLACIREGUI, M. et al. Freeze-dried dog sperm: Dynamics of DNA integrity. **Cryobiology**, v. 71, n. 2, p. 286-290, 2015.

OLACIREGUI, M. et al. Chelating agents in combination with rosmarinic acid for boar sperm freeze-drying. **Reproductive biology**, v. 17, n. 3, p. 193-198, 2017.

OLACIREGUI, M. et al. In vitro developmental ability of ovine oocytes following intracytoplasmic injection with freeze-dried spermatozoa. **Relatórios científicos**, v. 7, n. 1, pág. 1096, 2017.

PALAZZESE, L. et al. DNA fragmentation in epididymal freeze-dried ram spermatozoa impairs embryo development. **Journal of Reproduction and Development**, v. 64, n. 5, p. 393-400, 2018.

PALAZZESE, L. et al. 40 Comparison of slow and rapid freezing in freeze-dried ram spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 32, n. 2, p. 146-146, 2020.

PAOLI, D. et al. Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 7, p. 2315-2319, 2011.

PAPA, F.O. et al. Viabilidade espermática pós-descongelação de sêmen bovino criopreservados com meio diluente glicina-gema em quatro diferentes tempos de estabilização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 24, n. 1, p. 39-43, 2000..

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, n. 2, p. 209-222, 1992.

PEGG, D.E. The history and principles of cryopreservation. In: **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 20, n.1, p. 5-14, 2002.

PIKAL, M.J. **Freeze-drying of proteins**. In: Cleland, J. L.; Langer, R. (Eds.). *Formulation and delivery of proteins and peptides*. Washington, D.C.: American Chemical Society, 1994. p. 120-133. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bk-1994-0567.ch008>. Acesso em: 8 mar. 2025.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, n. 4172, p. 666-666, 1949.

PUGLISI, R. et al. The usefulness of combining traditional sperm assessments with in vitro heterospermic insemination to identify bulls of low fertility as estimated in vivo. **Animal Reproduction Science**, v. 132, n. 1-2, p. 17-28, 2012.

RAMLØV, H.; WESTH, P. Cryptobiosis in the eutardigrade *Adorybiotus* (Richtersius) coronifer: tolerance to alcohols, temperature and de novo protein synthesis. **Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology**, v. 240, n. 3-4, p. 517-523, 2001.

RINDLER, V. **Untersuchungen zur Gefriertrocknung biologischer Zellen am Beispiel menschlicher Erythrozyten**. 2000. Tese de Doutorado. Aachen, Techn. Hochsch., Diss., 2000.

RINGLEB, J. et al. Prolonged storage of epididymal spermatozoa does not affect their capacity to fertilise in vitro-matured domestic cat (*Felis catus*) oocytes when using ICSI. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 6, p. 818-825, 2011.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, n. 4, p. 312-318, 2003.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. **Methods for sperm evaluation and their relationship to fertility**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, 2005, Goiânia. Palestras... Goiânia: CBRA, p. 1-9, 2005..

SARAGUSTY, J. et al. Dry biobanking as a conservation tool in the Anthropocene. **Theriogenology**, v. 150, p. 130-138, 2020.

SARAGUSTY, J.; LOI, P. Exploring dry storage as an alternative biobanking strategy inspired by Nature. **Theriogenology**, v. 126, p. 17-27, 2019.

SAS INSTITUTE INC. *Statistical Analysis System (SAS/STAT Program, Version X)*. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2008.

SHAHBA, M.I. et al. The effect of freeze-drying media and storage temperature on ultrastructure and DNA of freeze-dried buffalo bull spermatozoa. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 5, n. 6, p. 524-535, 2016.

SHAHMORADI, E.; BAHEIRAEI, N.; HALVAEI, I. Trehalose attenuates detrimental effects of freeze-drying on human sperm parameters. **Biopreservation and Biobanking**, v. 20, n. 1, p. 31-37, 2022.

SHARMA, Y.; SHARMA, M. Biophysics of Cryopreservation. **International Journal of Thermodynamics**, p. 1-11, 2022.

SINGER, T.M. et al. Detection of induced male germline mutation: correlations and comparisons between traditional germline mutation assays, transgenic rodent assays and expanded simple tandem repeat instability assays. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 598, n. 1-2, p. 164-193, 2006.

SINGH, A.K. et al. Nutrition and bull fertility: A review. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 6, n. 6, p. 635-643, 2018.

STANISHEVSKAYA, O. et al. A successful protocol for achieving anhydrobiosis of Gallus Gallus Domesticus spermatozoa while maintaining their fertility IN VIVO. **Cryobiology**, v. 104, p. 102-106, 2022.

SUAREZ, S.S.; PACEY, A.A. Sperm transport in the female reproductive tract. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 1, p. 23-37, 2006.

SZCZYGIEL, M.A.; WARD, W.S. Combination of dithiothreitol and detergent treatment of spermatozoa causes paternal chromosomal damage. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 5, p. 1532-1537, 2002.

TARTAGLIONE, C.M.; RITTA, M.N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 62, n. 7, p. 1245-1252, 2004.

TATENO, H.; KAMIGUCHI, Y. How long do parthenogenetically activated mouse oocytes maintain the ability to accept sperm nuclei as a genetic partner?. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 22, p. 89-93, 2005.

THIANGTHIENTHAM, P. et al. Effects of freeze-drying on the quality and fertilising ability of goat sperm recovered from different parts of the epididymis. **Theriogenology**, v. 195, p. 31-39, 2023.

TOSHIMORI, K.; EDDY, E.M. The Spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (Eds.). *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 4. ed. San Diego: Elsevier, p. 99-148. 2015.

TOSTI, E.; MÉNÉZO, Y. Gamete activation: basic knowledge and clinical applications. **Human Reproduction Update**, v. 22, n. 4, p. 420-439, 2016.

TUMOVA, L. et al. Ligands and receptors involved in the sperm-zona pellucida interactions in mammals. **Cells**, v. 10, n. 1, p. 133, 2021.

ÜSTÜNER, B. et al. Effect of Freeze-Drying Extenders on Ram Sperm DNA Integrity. **Journal of Research in Veterinary Medicine**, v. 40, n. 1, p. 25-30, 2021.

WAKAYAMA, S. et al. Healthy offspring from freeze-dried mouse spermatozoa held on the International Space Station for 9 months. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 23, p. 5988-5993, 2017.

WANG, C.; SWERDLOFF, R.S. Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests. **Fertility and Sterility**, v. 102, n. 6, p. 1502-1507, 2014.

WARD, M.A. et al. Long-term preservation of mouse spermatozoa after freeze-drying and freezing without cryoprotection. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 6, p. 2100-2108, 2003.

WATANABE, H. et al. Pronuclear formation of freeze-dried canine spermatozoa microinjected into mouse oocytes. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 26, p. 531-536, 2009.

WENG, L. Technologies and applications toward preservation of cells in a dry state for therapies. **Biopreservation and Biobanking**, v. 19, n. 4, p. 332-341, 2021.

WHALEY, D., et al. Cryopreservation: an overview of principles and cell-specific considerations. **Cell Transplantation**, v. 30, p. 1-12, 2021.

YANG, S. et al. Melatonin supplementation to the freezing medium enhances post-thaw sperm quality and fertility of giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*). **Aquaculture Reports**, v. 31, p. 101662, 2023.

YUSHCHENKO, N.P. Proof of the possibility of the spermatozoa in dried state, Proc. Lenin. **Archives of Agriculture and Environmental Science**, v. 22, p. 37-40, 1957.

ZATSEPINA, O. et al. The step-wise assembly of a functional nucleolus in preimplantation mouse embryos involves the cajal (coiled) body. **Developmental Biology**, v. 253, n. 1, p. 66-83, 2003.

CAENAZZO, L.; TOZZO, P. The future of biobanking: what is next? **BioTech**, Basel, v. 9, n. 4, p. 23, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biotech9040023>. Acesso em: 23 janeiro 2025.

MULLER, R. et al. Preservation of biospecimens at ambient temperature: Special focus on nucleic acids and opportunities for the biobanking community. **Biopreservation and Biobanking**, v. 14, n. 2, p. 89-98, 2016.

LOU, J. J. et al. A review of room temperature storage of biospecimen tissue and nucleic acids for anatomic pathology laboratories and biorepositories. **Clinical biochemistry**, v. 47, n. 4-5, p. 267-273, 2014.

RAMÍREZ-AGÁMEZ, L. et al. Sperm factors associated with the production of equine blastocysts by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v. 195, p. 85-92, 2023.

NAMBO, Y. et al. In vitro embryo production via ovum pick-up (OPU) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in Japanese Hokkaido native ponies. **SSRN Electronic Journal**, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.2139/ssrn.5039900>. Acesso em: 23 janeiro 2025.

SAMPER, J.C. et al. THE USE OF SEX-SORTED SEMEN IN HORSES. **Journal of Equine Veterinary Science**, p. 105251, 2024.

UNNIKRISHNAN, V.; KASTELIC, J.; THUNDATHIL, J. Intracytoplasmic sperm injection in cattle. **Genes**, v. 12, n. 2, p. 198, 2021.

KAGAWA, S. et al. Cattle production by intracytoplasmic sperm injection into oocytes vitrified after ovum pick-up. **Theriogenology**, v. 185, p. 121-126, 2022.

ELORIAGA, M. B. A. et al. Factors influencing the intracytoplasmic sperm injection (ICSI) efficacy in goat and sheep. **Journal of Livestock Science**, v. 15, n. 15, 2024.

KRESNA, A. et al. Calcium ionophore as oocyte activator to fertilization rate and cleavage level on kacang goat post intracytoplasmic sperm injection (ICSI). **Teikyo Medical Journal**, v. 44, n. 4, p. 1031-1037, 2021.

RESSAISSI, Y. et al. The impaired development of sheep ICSI derived embryos is not related to centriole dysfunction. **Theriogenology**, v. 159, p. 7-12, 2021.

NAKAI, M. et al. Oocyte activation with phospholipase C ζ mRNA induces repetitive intracellular Ca²⁺ rises and improves the quality of pig embryos after intracytoplasmic sperm injection. **Journal of Reproduction and Development**, v. 70, n. 4, p. 229-237, 2024.

BRISKI, O. et al. 81 Pronuclear formation and SMARCA4 incorporation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) or assisted ICSI in pig zygotes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 33, n. 2, p. 148-148, 2021.

SAID, S.; AFIATI, F.; MAULANA, T. Study on changes of sperm head morphometry and DNA integrity of freeze-dried bovine spermatozoa. **Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture**, v. 40, n. 3, p. 145-152, 2015.

KAZORGAH, F. M. et al. The effect of temperature and storage time on DNA integrity after freeze-drying sperm from individuals with normozoospermia. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, v. 51, n. 1, p. 42, 2023.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7^a Edição. São Paulo: Ed. Manole, 2004.

MOSTEK, A. et al. Bull sperm capacitation is accompanied by redox modifications of proteins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 15, p. 7903, 2021.

TEVES, M.E.; ROLDAN, E.R. Sperm bauplan and function and underlying processes of sperm formation and selection. **Physiological reviews**, v. 102, n. 1, p. 7-60, 2022.

GRAHAM, J.K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen / thawed semen. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 492-504, 2005.

YÁNIZ, J.L. et al. CASA-Mot in mammals: an update. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 30, n. 6, p. 799-809, 2018.

DEN DAAS, J.H.G. et al. The relation between number of spermatozoa inseminated per dose of semen and non-return rates for different sires. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 320–327, 1992.

DEN DAAS, J.H.G. et al. The relationship between the number of spermatozoa inseminated and the reproductive efficiency of individual dairy bulls. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 6, p. 1714-1723, 1998.

MORTIMER, Sharon T.; MAXWELL, W.M.C. Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 11, n. 1, p. 25-30, 1999.

AMANN, R.P.; KATZ, D.F. Andrology lab corner*: Reflections on casa after 25 years. **Journal of andrology**, v. 25, n. 3, p. 317-325, 2004.

ARRUDA, R.P. de et al. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 145-151, 2011.

THUN, R.; HURTADO, M.; JANETT, F. Comparison of Biociphos-Plus® and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. **Theriogenology**, v. 57, n. 3, p. 1087-1094, 2002.

BARBAS, J.P.; MASCARENHAS, R. D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell and tissue banking**, v. 10, p. 49-62, 2009.

WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: MORRIS, G. J.; CLARKE, A. (Ed.). **Effects of low temperatures on biological membranes**. London: Academic Press, 1981. p. 189–218.

GOUSSET, K. et al. Evidence for a physiological role for membrane rafts in human platelets. **Journal of cellular physiology**, v. 190, n. 1, p. 117-128, 2002.

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

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of equine veterinary science**, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, n. 4, p. 871-891, 1995.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 9, n. 3, p. 321-332, 1997.

KHOSROWBEYGI, A.; ZARGHAMI, N. Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of oxidative stress biomarkers in subfertile males. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 77, n. 2, p. 117-121, 2007.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American journal of physiology-cell physiology**, v. 247, n. 3, p. C125-C142, 1984.

CROWE, J.H.; CROWE, L. M.; CHAPMAN, D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. **Science**, v. 223, n. 4637, p. 701-703, 1984.

RAJSKA, I. Freeze drying as a method of long-term conservation of mammalian semen—a review. **Annals of Animal Science**, v. 21, n. 4, p. 1209-1234, 2021.

KATAYOSE, H.; MATSUDA, J.; YANAGIMACHI, R. The ability of dehydrated hamster and human sperm nuclei to develop into pronuclei. **Biology of Reproduction**, v. 47, n. 2, p. 277-284, 1992.

AL-GHALBAN, A.M.; TABBAA, M.J.; KRIDLI, R.T. Factors affecting semen characteristics and scrotal circumference in Damascus bucks. **Small ruminant research**, v. 53, n. 1-2, p. 141-149, 2004.

PASCAL, C. et al. The Influence of Season and Age on Specific Semen Traits and Reproductive Behavior in Carpatina Breed Bucks. **Agriculture**, v. 14, n. 11, p. 2092, 2024.

SOUZA, L.E.B. de et al. Puberty and sexual maturity in Anglo-Nubian male goats raised in semi-intensive system. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 1533-1539, 2011.

MARTINEZ, M.L. et al. Correlações entre características da qualidade do sêmen e a circunferência escrotal de reprodutores da raça Gir. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 700-706, 2000.

RONDA, J.B. et al. Classificação andrológica por pontos e características andrológicas na avaliação reprodutiva de touros da raça Gir candidatos ao teste de progênie. **Ciência Animal Brasileira**, v. 20, p. e-44670, 2019.

OLIVEIRA, G.D. de. Efeito de diferentes tempos de resfriamento pré-congelamento na previsão espermática do sêmen descongelado de caprino. 2013.

WINKLE, T. et al. The correlation between male age, sperm quality and sperm DNA fragmentation in 320 men attending a fertility center. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 26, p. 41-46, 2009.

KIPPER, B.H. et al. Sperm morphometry and chromatin condensation in Nelore bulls of different ages and their effects on IVF. **Theriogenology**, v. 87, p. 154-160, 2017.

FILIPČÍK, R. et al. Evaluation of semen parameters from Fleckvieh–Simmental bulls and the influence of age and season of collection. **Archives Animal Breeding**, v. 66, n. 1, p. 113-120, 2023.

ABOEL-HASSAN, A.H.; ABU ELNAGA, N.A.; GHANEM, N. Post-thaw sperm morphokinetics and mitochondrial genes profile of buck semen supplemented with selenium in two different forms. **Egyptian Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 2, p. 382-390, 2024.

BOSSI, R. L. Análise da ultraestrutura do espermatozoide humano após liofilização. 2015. 97 f. Tese (Doutorado em Saúde da Mulher) – **Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina, Belo Horizonte**, 2015. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1843/BUBD-AJSQ75>. Acesso em: 24 janeiro 2025.

PHAVAPHUTANON, J. et al. Effect of Rosmarinic Acid on Dog Semen Quality after Freeze-drying by Applying Freeze-drying Machines for Vaccine Production. **The Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 54, n. 1, p. 35-43, 2024.

BITTENCOURT, R. F. et al. O efeito do tempo de equilíbrio sobre a qualidade do sêmen caprino criopreservado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 7, n. 1, p. 27–37, 2006. Disponível em: <https://repositorio.ufba.br/handle/ri/1900>. Acesso em: 24 janeiro 2025.