



Abanico Veterinario. Janeiro-Dezembro 2023; 13:1-13. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2023.13>
Artigo original. Recebido: 21/11/2023. Aceito: 20/05/2023. Publicado:27/06/2023. Chave: e2022-77.
<https://www.youtube.com/watch?v=0rYTQI3wmoU>

Efeito decapitante das proteínas oviductais em espermatozoides de galo *in vitro*

Decapitating effect of oviductal proteins in rooster spermatozoa *in vitro*



Cruz-Valencia Cuauhtémoc*¹ ID, Guerrero-Barrera Alma² ID, Quintanar-Stephano
José³ ID, Herrera-Barragán José^{**4} ID, Pérez-Rivero Juan⁴ ID

¹Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Av. Universidad # 940, C.U., 20131 Aguascalientes, México. ²Departamento de Morfología. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Av. Universidad # 940, Ciudad Universitaria., 20131 Aguascalientes, México. ³Departamento de Fisiología y Farmacología. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Av. Universidad # 940, C.U., 20131 Aguascalientes, México. ⁴Departamento de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100. Villa Quietud. Coyoacán. CP. 04960. CDMX, México. *Autor responsável: Cruz-Valencia Cuauhtémoc. **Autor para correspondência: Herrera-Barragán José. E-mail: cuaubiol@hotmail.com, alquerque@correo.uaa.mx, jlquinta@correo.uaa.mx, jherrera@correo.xoc.uam.mx, jjperez1_1999@yahoo.com

RESUMO

Em aves domésticas, o processo de maturação dos espermatozoides não foi totalmente descrito. O objetivo do estudo foi determinar os parâmetros *in vitro* do efeito incapacitante das proteínas oviductais sobre os espermatozoides de galos. Aliquotas com espermatozoides foram incubadas *in vitro* para induzir estados metabólicos de capacitação, desabilitação e reação acrossomal para determinar as porcentagens de espermatozoides vivos, sua motilidade e concentrações de malondialdeído, glutatona reduzida e trifosfato de adenosina como parâmetros do estado metabólico dos espermatozoides. Os resultados mostraram porcentagens de motilidade e espermatozoides vivos no sêmen fresco e capacitado semelhantes ($P > 0,05$), mas maiores ($P < 0,05$) do que as determinadas em espermatozoides com reação acrossomal. O nmol/ml de MDA no sêmen fresco (1,59) foi maior ($P < 0,005$) do que nos espermatozoides capacitados (1,05), com reação acrossomal (1,07) e não capacitados (1,05). Os nmol/ml de GSG foram semelhantes ($P > 0,05$) em sêmen fresco (72,6) e capacitado (62,04), e entre sêmen com reação acrossomal (99,09) e não capacitado (86,07). A maior concentração de ATP foi no sêmen capacitado com 69,9 $\mu\text{mol/ml}$, com concentrações semelhantes ($P < 0,05$) no sêmen fresco, com reação acrossomal e não capacitado. Os parâmetros determinados mostraram que a fração proteica da junção útero-vaginal, *in vitro*, produz decapitação e mantém a viabilidade dos espermatozoides.

Palavras-chave: adenosina trifosfato, glutatona reduzida, malondialdeído, oxidação, esperma.

ABSTRACT

In birds, the process of sperm maturation has not been fully described. The objective of this study was to determine *in vitro* parameters for the decapitating effect of oviductal proteins on rooster spermatozoa. Aliquots with spermatozoon were incubated to *in vitro* induce metabolic states: capacitation, decapacitation, and the acrosomal reaction to again determined percentages of live spermatozoa, motility, and concentrations of Malondialdehyde, reduced Glutathione and Adenosine triphosphate. The percentages of motility and live sperm in fresh and capacitated semen were similar ($P > 0.05$), but higher ($P < 0.05$) than those determined in decapacitated semen and with acrosome reaction. The determination of nmol/ml of MDA in



fresh semen (1.59) was higher ($P < 0.005$) than in capacitated semen (1.05), with acrosomal reaction (1.07) and decapacitated semen (1.05). GSH nmol/ml were similar ($P > 0.05$) in fresh (72.6) and capacitated (62.04) semen, similarly ($P < 0.05$) between acrosome reaction (99.09) and decapacitated (86.07) semen. The highest concentration of ATP was in capacitated semen with 69.9 $\mu\text{mol/ml}$, with similar concentrations ($P < 0.05$) in fresh, with acrosomal reaction, and decapacitated semen. The parameters, determined, demonstrated that the protein fraction of the utero-vaginal junction, *in vitro*, produces decapacitation and successfully maintains sperm viability.

Keywords: adenosine triphosphate, reduced glutathione, malondialdehyde, oxidation, semen.

INTRODUÇÃO

As aves apresentam características morfofisiológicas reprodutivas específicas que são distintas das dos mamíferos. No trato reprodutivo do galo, essas características incluem a ausência de glândulas acessórias que fornecem fluidos para o ejaculado (Álvarez *et al.*, 2020), e de uma estrutura como o epidídimo dos mamíferos, que participa da maturação e do armazenamento espermático (Asano & Tajima, 2017). Há relatos de que o sêmen de galo "não requer capacitação espermática" para atingir a capacidade de fertilização (Lemoine *et al.*, 2011), mas um estudo separado identificou um período necessário de capacitação espermática de 40 minutos de duração que pode ser induzido *in vitro* usando um meio enriquecido com Ca^{2+} .

Os túbulos de armazenamento de espermatozoides (SST) foram identificados na junção útero vaginal (JUV) no oviduto da galinha, que contribuem para a decapacitação dos espermatozoides para armazenamento por meio da metabolização de ácidos graxos ou outros lipídios pelos espermatozoides (Long & Conn, 2012; Sasanami, 2013); pesquisas recentes demonstraram um efeito decapacitante *in vitro* das proteínas oviductais, mas não descreveram nenhum parâmetro característico do metabolismo espermático (Camarillo *et al.*, 2019). Durante a capacitação espermática, ocorrem alterações bioquímicas e modificações na fluidez da membrana celular, além de mudanças no pH intercelular, aumento da permeabilidade a íons Ca^{2+} , modificação dos padrões de fosforilação de proteínas e composição lipídica. A capacitação dos espermatozoides é um pré-requisito para a reação de acrossoma, a fim de atingir sua capacidade de fertilização. No trato reprodutivo das aves, as SST foram descritas, no JUV, as secreções celulares dessas estruturas podem induzir a decapacitação dos espermatozoides para armazenamento ((Sasanami, 2013; Camarillo *et al.*, 2019; González *et al.*, 2019).

Esses ácidos graxos, que podem ser obtidos na dieta das aves (Olubowale *et al.*, 2014; Ashraf *et al.*, 2020), contribuem para manter a viabilidade dos espermatozoides e garantir a fertilização dos oócitos por até sete dias após a cópula (Bakst, 2010).

Estudos não revelaram nenhuma diferença nos espermatozoides e em sua morfometria à medida que passam pelo trato reprodutivo do galo, mas, em contraste, há extensas descrições das secreções glandulares no oviduto da galinha, associadas principalmente à formação do óvulo (Zhong *et al.*, 2020). No entanto, os espermatozoides devem



completar seu trânsito por esse trato para chegar ao local de fertilização (Álvarez *et al.*, 2017). Há poucos estudos sobre as condições do trato reprodutivo da galinha em relação ao armazenamento, à maturação e à ativação dos espermatozoides.

A falha reprodutiva pode estar associada a até 50 % dos machos; sabe-se que o estresse oxidativo, determinado por um aumento do malondialdeído (MDA) no sêmen, pode estar associado a danos no axonema, produzir alterações morfológicas na peça intermediária e diminuir a motilidade dos espermatozoides (Kurkowska *et al.*, 2020); a glicólise e a oxidação mitocondrial contribuem para a produção de trifosfato de adenosina (ATP) por meio da fosforilação oxidativa para a manutenção da motilidade flagelar no cozimento do esperma (Setiawan *et al.*, 2021) e o efeito positivo da glutathione (GSH) também demonstrou proteger os espermatozoides do estresse oxidativo (Masoudi *et al.*, 2019).

Embora a eficácia reprodutiva do galo seja bem conhecida devido às suas porcentagens adequadas de fertilidade (Nakamura, 2017), a implementação da inseminação artificial em fazendas de produção pode reduzir os custos de produção ao diminuir o número de galos necessários. Além disso, o sêmen pode ser transportado para várias estações ou locais em condições de maior biossegurança que garantam a conservação do germoplasma das linhas germinativas primárias do avô e do bisavô (Nakamura, 2017).

Até o momento, a inseminação artificial tem utilizado dois meios de conservação seminal, chamados de extensores de sêmen Beltsville e Lake Poultry, que foram desenvolvidos há mais de 40 anos, principalmente para uso em perus. O único trabalho subsequente realizado com esses dois métodos foi projetado para modificar a concentração de seus componentes, refletindo assim os modestos avanços em nosso conhecimento da biologia reprodutiva dessa espécie e a escassa utilização desse conhecimento para o desenvolvimento biotecnológico (Asano & Tajima, 2017).

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi determinar parâmetros *in vitro* para o efeito decapitante das proteínas oviductais da galinha sobre o esperma do galo. Essa pesquisa contribuirá para o desenvolvimento de novos meios de conservação do sêmen que aumentarão a viabilidade dos espermatozoides durante o manuseio e o armazenamento *in vitro*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Experimento

Sêmen fresco, em cada estado metabólico, foi realizada a avaliação básica e a medição do malondialdeído (MDA), da glutathione reduzida (GSH) para confirmar sua função de membrana e dos níveis de ATP para verificar a atividade energética; com isso foi avaliada a viabilidade espermática e os parâmetros de maturidade e decapitação dos espermatozoides.

Uso de animais

O estudo atendeu plenamente às exigências nutricionais dos animais, oferecendo ração comercial com 17 % de proteína bruta, que fornece os nutrientes necessários para a



criação de aves para fins zootécnicos; os animais foram mantidos com água *ad libitum*. Eles foram alojados individualmente em gaiolas de 90 X 90 X 120 cm, com altura de poleiro de 90 cm (Applegate & Angel, 2014). Condições adequadas de alojamento foram fornecidas durante todo o estudo. Os participantes do estudo foram cinco galos da raça Lohman. Para obter fluidos do oviduto, foram utilizadas 10 galinhas no segundo terço de postura, alojadas individualmente em condições semelhantes.

Obtenção de sêmen

Os ejaculados foram obtidos por massagem dorsoventral realizada três vezes por semana em cada galo (Camarillo *et al.*, 2019). Os ejaculados foram combinados para formar um total de 25 pool de sêmen, depositando no mesmo frasco o sêmen dos cinco galos. O sêmen foi coletado da cloaca por aspiração usando uma micropipeta SL10-1000 (RANIN™, EUA). Cada pool de sêmen foi então misturado com o meio Lake contendo 0,6 % de frutose, 1,92 % de glutamato de sódio, 0,08 % de acetato de magnésio, 0,51 % de acetato de sódio e 0,128 % de citrato de potássio, pH 7,2 e 330 mOms. Somente ejaculados que satisfaçam os critérios seminais normais: 5 % de motilidade, 90 % de espermatozoides vivos e < 5 % de espermatozoides anormais foram usados (Fattah *et al.*, 2017).

Coleta e quantificação da fração proteica do fluido oviductal

A cloaca foi evertida para inserir uma sonda de calibre 12 a uma profundidade de 3 cm no oviduto e depositar 3 ml de meio Lake na união uterovaginal (UVU), seguido pela coleta de aproximadamente 1,54 ml de líquido do oviduto para formar um pool. O fluido extraído das 10 galinhas foi mantido a 2 °C para manuseio (Ito *et al.*, 2011). Ele foi filtrado em um filtro de células de 70 µm e, em seguida, centrifugado por 30 minutos a 1500 x g. O sobrenadante foi armazenado a -20 °C até o uso (Sedaghat *et al.*, 2021). A fração proteica da UVU foi precipitada usando 4 volumes de acetona a 2 °C por 30 minutos, seguida de centrifugação a 14.000 x g por 10 minutos. O sedimento foi recuperado pela evaporação do sobrenadante em nitrogênio líquido (Sedaghat *et al.*, 2021). A técnica de espectrofotometria foi utilizada para quantificar a concentração de proteína, em um comprimento de onda de 595 nm (Ku *et al.*, 2013).

Para descrever a fração proteica por eletroforese unidimensional, 20 µg da proteína obtida foram colocados em um tampão da amostra (Tris 0,5 M a pH 6,8, SDS 10 %, glicerol, 0,5 % de azul de bromofenol e 5 % de β-mercaptoetanol) e mantidos a 100 °C por 3 min. A eletroforese exigiu a preparação de um gel de separação a 10 % e um gel de compactação a 4 % com 30 % de acrilamida/Bis a 37,5:1 (2,6 % C). A separação foi realizada em uma câmara de eletroforese a 200 volts por 45 minutos. A solução tampão do eletrodo foi preparada com 0,025 M Tris, 0,192 M glicina e SDS a 0,1% (p/v) para um pH de 8,3 (Sajjadi *et al.*, 2019).



Indução de estados metabólicos nos espermatozoides

Alíquotas de 200×10^6 espermatozoides em 1 ml de meio Lake foram usadas em cada condição metabólica; o sêmen fresco foi avaliado antes de decorridos 10 minutos após a ejaculação (Camarillo *et al.*, 2019). Os espermatozoides de capacitação foram induzidos pela incubação do sêmen 1:1 em meio Lake por 40 minutos a 38 °C.

Para induzir a decapacitação, os espermatozoides foram incubados por 40 minutos a 37,5 °C e, em seguida, diluídos 1:1 em meio Lake suplementado com 200 µg/ml da fração proteica da UVU sob condição de escuridão (Camarillo *et al.*, 2019). A reação acrossômica foi determinada em espermatozoides que foram coincubados com 20 µg de PVL para induzir a reação acrossômica (Lemoine *et al.*, 2011; Camarillo *et al.*, 2019).

Avaliação básica do esperma

A porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva reta em 15 µl de sêmen foi estimada por microscopia (OLYMPUS BX51) com uma objetiva de 40X a 37,5 °C. Além disso, 10 µL de sêmen foram corados com eosina-nigrosina (QCA, 996518, EUA) e 100 espermatozoides de cada amostra foram analisados para avaliar a viabilidade e a morfologia em um microscópio óptico (OLYMPUS BX51) (Jabbar *et al.*, 2015; Fischer *et al.*, 2015).

Parâmetros metabólicos dos espermatozoides

Malondialdeído (MDA). A concentração de nMol de MDA/ml foi quantificada (Najafi *et al.*, 2021). Nesse caso, 1 ml de ácido tricloroacético a 20 % foi adicionado a uma alíquota de sêmen com 100×10^6 espermatozoides e centrifugado por 15 min $1500 \times g$. O sobrenadante foi removido e 1 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,67 % foi adicionado para incubação a 100 °C por 10 minutos. Sob condições de pH baixo e alta temperatura, o MDA reage com o TBA para gerar um aduto MDA-TBA que pode ser lido em um espectrofotômetro a 532 nm, utilizando o butanol como alvo.

Glutathiona reduzida (GSH). Para determinar a concentração de GSH, foram utilizadas uma reação de fluorescência e espectrofluorometria (Najafi *et al.*, 2021). Alíquotas de 250 µl de sêmen ejaculado contendo 200×10^6 foram homogeneizadas em um vórtex por 3 minutos para lisar os espermatozoides. Em seguida, foram adicionados 3,70 ml de tampão fosfato com pH 8, seguido de 1 ml de ácido metafosfórico a 25 %. Isso foi centrifugado a $1500 \times g$ por 30 minutos a 4 °C para liberar o GSH. Isso permitiu a recuperação de 0,5 ml de sobrenadante, que foi ajustado com 4,5 ml de tampão fosfato para pH 8. Depois disso, 100 µL da mistura anterior foram recuperados e 1,8 ml de tampão fosfato com pH 8 foram adicionados. Isso foi misturado em um vórtex, e 100 µL de OPT a 0,1 % foram adicionados para homogeneizar e estabilizar a mistura por 15 minutos em condições de escuridão. A determinação foi realizada em um



espectrofluorômetro a uma taxa de emissão de 420 nm, excitação de 350 nm e 5 SLIT por 5 segundos.

Trifosfato de adenosina (ATP). A determinação da concentração de ATP nos espermatozoides exigiu o kit de ensaio de bioluminescência de adenosina 5'-trifosfato (ATP) (SIGMA Life Science), que determinou que a emissão luminosa era diretamente proporcional à quantidade de ATP presente (Nguyen *et al.*, 2016). Isso foi quantificado em um espectrofluorômetro Perkin Elmer LS usando o aplicativo de concentração. Uma alíquota de sêmen com 200X106 espermatozoides foi lisada para recuperar 50 µl da lise, que foram colocados em uma célula de espectrofotômetro com 50µL de reagente do ATP Bioluminescence Assay Kit. O espectrofotômetro determinou a concentração de ATP em cada amostra e a comparou com a intensidade emitida pela solução padrão de 100 micromoles de ATP que o kit contém.

Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos ao teste de bondade e ao ajuste de Jaque-Bera, para verificar a normalidade dos dados; para isso, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) para determinar as diferenças entre as variáveis ($P < 0,05$). Um teste de Tukey foi usado para determinar as diferenças entre a média e os valores das variáveis nos diferentes estados metabólicos. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software de acesso livre PAST (Hammer *et al.*, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parâmetros básicos de avaliação. As porcentagens de motilidade espermática (Tabela 1) foram semelhantes ($P > 0,05$) no sêmen fresco e nos espermatozoides capacitados, 96,8 e 91,5 %, respectivamente. Essas porcentagens foram maiores ($P < 0,05$) do que as determinadas para os espermatozoides com reação acrossomal (61 %) e os espermatozoides decapitados (40 %). Os resultados para os dois últimos foram semelhantes ($P > 0,05$).

Com relação aos espermatozoides decapitados e àqueles com reação acrossomal, embora a motilidade fosse evidente e semelhante, ela foi menor do que nos outros estados metabólicos. Entretanto, as porcentagens de espermatozoides vivos demonstraram viabilidade espermática em todas as condições avaliadas.

Na ausência de um ciclo estral característico dos mamíferos, que sincroniza a cópula com a ovulação, a reprodução em aves depende do armazenamento de espermatozoides no oviduto da fêmea (Bakst, 2010) para garantir que os espermatozoides com capacidade de fertilização estejam disponíveis quando o oócito estiver presente para fertilização no infundíbulo. Na presença de túbulos de armazenamento de esperma, os



espermatozoides depositados no aparelho reprodutor da fêmea podem sobreviver por 2 a 15 semanas em aves domésticas, como galinhas e perus (Sasanami, 2013).

As porcentagens de espermatozoides vivos (Tabela 1) foram semelhantes ($P>0,05$) entre o sêmen fresco (97,6 %) e os espermatozoides capacitados (91,6 %), e significativamente maiores ($P<0,05$) do que nos espermatozoides com reação acrossomal (72,9 %) e nas amostras decapitadas (64,4 %). As duas últimas condições apresentaram porcentagens semelhantes ($P>0,05$).

Em geral, as porcentagens de motilidade e de espermatozoides vivos determinadas neste estudo foram altas e semelhantes nos espermatozoides ejaculados e capacitados. Esse achado está de acordo com relatos de outros autores (Restrepo *et al.*, 2016), que observaram uma alta motilidade chamada hiperatividade na capacitação espermática, que é característica desse estado metabólico. A hiperativação espermática também é caracterizada por uma motilidade intensa e não progressiva com uma baixa frequência de abanar a cauda.

Tabela 1. Parâmetros *in vitro* da avaliação básica espermática nos diferentes estados metabólicos

Espermatozóides	Condição metabólica do sêmen ($X\pm EP$) n=25			
	Fresco	Capacitado	Com reação de acrossoma	Decapitado
Motilidade %	96.8 \pm 0.4 ^a	91.5 \pm 2.4 ^a	61.0 \pm 8.8 ^b	40.0 \pm 6.5 ^b
Ao vivo %	97.6 \pm 1.4 ^a	91.6 \pm 1.6 ^a	72.9 \pm 3.4 ^b	64.4 \pm 4.2 ^b

Literal diferente no superíndice entre as colunas indica diferença estatística ($P<0,005$)

($X\pm EP$): Média e erro padrão

Indicadores de estresse oxidativo. Estudos demonstraram que a fluidez da membrana pode ser alterada por modificações de moléculas como o colesterol e os fosfolípidios, que estão relacionados às proteínas envolvidas no reconhecimento gamético e na fusão da membrana. O papel dessas moléculas também foi demonstrado no armazenamento de esperma em túbulos para armazenamento espermático na UVU localizada no reprodutor da galinha. Atualmente, isso é entendido como uma sugestão de seu efeito como fatores decapitantes para manter a viabilidade espermática *in vivo* (Sasanami, 2013; Matsuzaki & Sasanami, 2022).

A concentração de MDA (Tabela 2) no sêmen fresco foi de 1,59 nmol/ml, significativamente maior ($P<0,05$) do que nos espermatozoides capacitados (1,05 nmol/ml), naqueles com reação acrossomal (1,07 nmol/ml) e nos espermatozoides decapitados (1,05 nmol/ml). É importante observar que as concentrações determinadas para os três últimos foram semelhantes ($P>0,05$).



As concentrações de GSH (Tabela 2) no sêmen fresco e nos espermatozoides capacitados foram semelhantes, com 72,6 e 62,04 nmol GSH/ml, respectivamente ($P>0,05$). Essa concentração nos espermatozoides com a reação acrossomal foi de 99,09 nmol GSH/ml, semelhante ($P>0,05$) à dos espermatozoides decapitados, com 86,07 nmol GSH/ml. No entanto, esses espermatozoides mantiveram níveis de estresse oxidativo, MDA e GSH que demonstraram estabilidade da membrana (Setiawan *et al.*, 2021).

Durante a capacitação e a reação acrossomal, ocorrem mudanças na membrana do espermatozoide; nossos estudos mostraram que as concentrações de MDA e GSH mantêm a integridade da membrana ao associar sua viabilidade à concentração de ATP também determinada em espermatozoides capacitados e decapitados.

Em outra descoberta significativa, os níveis de energia determinados pela concentração de ATP foram semelhantes nos espermatozoides capacitados e naqueles com reação acrossomal, ilustrando o efeito decapitante *in vitro* da fração proteica das secreções da UVU.

As concentrações de ATP (Tabela 2) no sêmen fresco, espermatozoides capacitados, espermatozoides com reação acrossomal e espermatozoides decapitados foram 59,41, 69,9, 66,49 e 51,79 μ mol ATP/ml, respectivamente. Essas concentrações são estatisticamente semelhantes ($P>0,05$). Nos espermatozoides de galo, a produção de ATP via glicólise foi demonstrada (Dávila *et al.*, 2015), portanto, encontrar concentrações semelhantes de ATP nas diferentes condições metabólicas avaliadas demonstra a viabilidade espermática em nosso estudo.

A viabilidade espermática *in vitro* dos espermatozoides decapitados nessas condições de estudo foi demonstrada pela determinação de que os níveis de energia exigidos pelos espermatozoides durante o processo de fertilização são semelhantes, independentemente de sua atividade ou estado metabólico, capacitação, reação acrossomal e/ou decapitação (Nguyen *et al.*, 2015). Além de manter sua viabilidade e as porcentagens de espermatozoides vivos e com motilidade, o estudo evidenciou a capacidade *in vitro* para a reação acrossomal na presença de PLV como indutor natural dessa reação em espermatozoides decapitados. Isso demonstrou a viabilidade espermática, que é conhecida por ser um parâmetro *in vitro* útil para prever a capacidade de fertilização *in vivo* dos espermatozoides (Lemoine *et al.*, 2011). Isso representa uma oportunidade de resgatar linhas genéticas de interesse zootécnico, com a implementação de técnicas de reprodução assistida em aves (Romo *et al.*, 2022)



Tabela 2. Parâmetros de estresse oxidativo no sêmen com diferentes estados metabólicos *in vitro*

	Condição metabólica do sêmen (X±EP)			
	Semen metabolic condition (X±EP)			
	Fresco	Capacitado	Com reação de acrossoma	Decapitado
Malondialdeído (MDA) nMol/ml	1.59±0.09 ^a	1.12±0.08 ^b	1.07±0.12 ^b	1.05±0.02 ^b
Glutathiona reduzida (GSH) nMol/ml	72.6±7.7 ^{ac}	62.04±5.1 ^a	99.09±3.6 ^b	86.07±8.1 ^{bc}
Adenosina trifosfato (ATP) µMol/ml	59.41±8.9 ^a	69.9±7.3 ^a	66.49±8.7 ^a	51.79±5.0 ^a

Literal diferente no superíndice entre as colunas indica diferença estatística (P<0,005)

Cada média foi determinada com os parâmetros obtidos em cinco testes realizados (n=5)

(X±EP): Média e erro padrão

Foi relatado que, após o processo de capacitação espermática, a motilidade diminui devido à energia limitada dos espermatozoides (Ferramosca, 2014). Em contraste, nossos estudos demonstraram concentrações semelhantes de ATP em espermatozoides capacitados, decapitados e com reação acrossomal. Isso revela uma necessidade evidente de desenvolver meios de conservação de esperma que limitem ou reduzam os gastos de energia metabólica pelos espermatozoides. As importantes descobertas deste estudo demonstram uma redução da motilidade nos espermatozóides nos quais o estado metabólico de decapitação foi induzido.

CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo demonstram parâmetros metabólicos em espermatozoides que estão associados à decapitação espermática *in vitro* induzida pela fração proteica do fluido da UVU. Essa fração proteica pode ser incluída como ingrediente em meios de preservação espermática *in vitro* para reduzir o metabolismo e manter a viabilidade do esperma.

Conflitos de interesse: Os autores declaram que não há conflito de interesses com relação à publicação deste artigo.

Declaração de financiamento: Este estudo não foi financiado por nenhuma organização

Contribuição dos autores:

CVC. Concebeu a ideia original do manuscrito e sua realização.

GBA. Supervisão e desenho dos experimentos

QSJ. Propostas metodológicas e sua implementação



HBJ. Concebeu a ideia original do manuscrito e a interpretação dos resultados.
PRJ. Análise estatística e revisão crítica do manuscrito

LITERATURA CITADA

ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ M, Ntzouni M, Wright D, Khan KI, López-Béjar M, Martínez CA, Rodríguez-Martínez H. 2020. Chicken seminal fluid lacks CD9- and CD44-bearing extracellular vesicles. *Reprod Domest Anim.* 55(3):293-300. ISSN: 439-0531. <https://doi.org/10.1111/rda.13617>

ASANO A, Tajima A. 2017. Development and Preservation of Avian Sperm. *Adv Exp Med Biol.* 1001:59-73. ISSN: 2214-8019. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3975-1_4

APPLEGATE TJ, Angel R. 2014. Nutrient requirements of poultry publication: History and need for an update. *J Appl Poult Res.* 23(3): 567-575. ISSN: 1056-6171. <https://doi.org/10.3382/japr.2014-00980>

ASHRAF S, Bhatti SA, Nawaz H, Khan MS. 2020. Assessment of dietary selenium sources in commercial male broiler breeders: effects on semen quality, antioxidant status and immune responses. *Pak Vet J.* 40(1): 13-18. ISSN 2074-7764. http://www.pvj.com.pk/abstract/40_1/19-130.htm

BAKST M. 2010. Role of the oviduct in maintaining sustained fertility in hens. *J Anim.* 89(5): 1323-1329. ISSN: 1525-3163. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3663>

CAMARILLO R, Jiménez I, Guzmán A, Rosales A, Rodríguez F, Pérez-Rivero JJ, Herrera JA. 2019. Oviductal proteins effect in rooster spermatic cryopreservation. *CryoLetters.* 40(6): 352-356. ISSN: 0143-2044. http://www.cryoletters.org/Abstracts/vol_40_6_2019.htm#352

DÁVILA PM, Martin M P, Tapia JA, Ortega F C, Balao C C, Peña FJ. 2015. Inhibition of Mitochondrial Complex I Leads to Decreased Motility and Membrane Integrity Related to Increased Hydrogen Peroxide and Reduced ATP Production, while the Inhibition of Glycolysis Has Less Impact on Sperm Motility. *PLoS One.* 10(9):e0138777. ISSN: 1932-6203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138777>

FATTAH A, Sharafi M, Masoudi R, Shaverdi A, Esmaeili V. 2017. L-carnitina is a survival factor for chilled storage of rooster semen for a long time. *Cryobiology.* 74:13-18. ISSN: 1090-2392. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.12.011>



FERRAMOSCA A, Zara V. 2014. Bioenergetics of mammalian sperm capacitation. *Biomed Res Int.* 2014:902953. ISSN: 2314-6141. <https://doi.org/10.1155/2014/902953>

FISCHER DH, Failing SK, Meinecke-Tillmann S, Wehrend A, Lierz M. 2020. Viability assessment of spermatozoa in large falcons (*Falco spp.*) using various staining protocols. *Reprod Domestic Anim.* 55(10):1383-1392. ISSN: 1439-0531. <https://doi.org/10.1111/rda.13785>

GONZÁLEZ-SANTOS, Jorge A, Ávalos-Rodríguez, Alejandro, Martínez-García, José A, Rosales-Torres, Ana M, Herrera-Barragán, José A. 2019. Sperm morphophysiology in different sections of the rooster reproductive tract. *Int J Morphol*, 37(3): 861-866. ISSN: 0717-9502. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022019000300861>

HAMMER Ø, Harper DAT and Ryan PD. 2001. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron.* 4(1):1–9. ISSN: 1094-8074. https://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf

ITO T, Yoshizaki N, Tokumoto T, Ono H, Yoshimura T, Tsukada A, Kansaku N, Sasanami T. 2011. Progesterone is a sperm-releasing factor from the sperm-storage tubules in birds. *Endocrinology.* 152(10):3952–3962. ISSN: 1945-7170. <https://doi.org/10.1210/en.2011-0237>

JABBAR A, Abbass W, Riaz A, Sattar A, Akram M. 2015. Effect of different concentrations of ascorbic acid on semen quality and hatchability of indigenous aseel chicken. *J Anim Plant Sci.* 25(5):1222-1226. ISSN: 1018-7081. <http://www.thejaps.org.pk/docs/v-25-05/03.pdf>

KU HK, Lim HM, Oh KH, Yang HJ, Jeong JS, Kim SK. 2013. Interpretation of protein quantitation using the Bradford assay: comparison with two calculation models. *Anal Biochem.* 434(1):178-80. ISSN: 1096-0309. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.10.045>

KURKOWSKA W, Bogacz A, Janiszewska M, Gabryś E, Tiszler M, Bellanti F, Kasperczyk S, Machoń-Grecka A, Dobrakowski M, Kasperczyk A. 2020. Oxidative stress is associated with reduced sperm motility in normal semen. *Am J Mens Health.* 14(5):1-8. ISSN: 1557-9891. <https://doi.org/10.1177/1557988320939731>

LEMOINE MS, Mignon-Grasteau I, Grasseau M, Magistrini E, Bleisbois E. 2011. Ability of chicken spermatozoa to undergo acrosome reaction after liquid storage or cryopreservation. *Theriogenology.* 75(1):122-130. ISSN: 1879-3231. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.07.017>



LONG J, Conn T. 2012. Use of phosphatidylcholine to improve the function of turkey semen stored at 4°C for 24hours. *Poult Sci.* 91(8):1990-1996. ISSN: 1525-3171. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-02028>

MASOUDI R, Sharafi M, Shahneh AZ, Khodaei-Motlagh M. 2019. Effects of reduced glutathione on the quality of rooster sperm during cryopreservation. *Theriogenology.* 1(128):149-155. ISSN: 1879-3231. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.01.016>

MATSUZAKI M, Sasanami T. 2022. Sperm Motility Regulation in Male and Female Bird Genital Tracts. *J Poult Sci.* 59(1):1-7. ISSN: 1346-7395. <https://doi.org/10.2141/jpsa.0200105>

NAJAFI A, Daghigh KH, Hamishehkar H. 2021. Does alpha-lipoic acid-loaded nanostructured lipid carriers improve post-thawed sperm quality and ameliorate apoptosis-related genes of rooster sperm? *Poult Sci.* 100(1):357-365. ISSN: 1525-3171. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.10.007>

NAKAMURA Y. Avian Biotechnology. 2017. *Adv Exp Med Biol.* 1001:187-214. ISSN: 2214-8019. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3975-1_12

NGUYEN TMD, Seigneurin F, Froment P, Combarous Y, Blesbois E. 2015. The 5'-AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Is Involved in the Augmentation of Antioxidant Defenses in Cryopreserved Chicken Sperm. *PLoS One.* 10(7):e0134420. ISSN: 1932-6203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134420>

NGUYEN QT, Wallner U, Schmicke M, Waberski D, Henning H. 2016. Energy metabolic state in hypothermically stored boar spermatozoa using a revised protocol for efficient ATP extraction. *Biol Open.* 5 (11):1743-1751. ISSN: 2046-6390. <https://doi.org/10.1242/bio.017954>

OLUBOWALE S, Greyling JPC, De Witt FH, Hugo A, Raito MB. 2014. Effects of dietary lipid sources on the semen quality of hy-line silver-brown cockerels. *J Anim Plant Sci.* 24(4):991-997. ISSN: 1018-7081. <http://www.thejaps.org.pk/docs/v-24-4/03.pdf>

RESTREPO G, Varela E, Usuga A. 2016. Evaluación de la calidad espermática epididimal en hipopótamos *Hippopotamus amphibius* (*Artiodactyla: hippopotamidae*) ubicados en el magdalena medio, Colombia. *Ac Zool Mex.* 32(2):158-167. ISSN: 2448-8445. <https://www.scielo.org.mx/pdf/azm/v32n2/0065-1737-azm-32-02-00158.pdf>



ROMO S, López D, Ledesma N, Gutiérrez C, Quintana A, Rangel L. 2022. Comparación en la calidad de huevos obtenidos en un sistema de producción en corrales al aire libre y los producidos en un sistema de jaula. *Rev Mex Cien Pec.* 13(1):32-42. ISSN: 2448-6698. <https://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/index.php/Pecuarias/article/view/5300/4696>

SAJJADI SH, Ahmadzadeh H, Goharshadi EK. 2019. Enhanced electrophoretic separation of proteins by tethered SiO₂ nanoparticles in an SDS-polyacrylamide gel network. *Analyst.* 145(2):415-423. ISSN: 1364-5528. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2020/an/c9an01759c>

SASANAMI TM. 2013. Sperm storage in the female reproductive tract in birds. *J Reprod Dev.* 59(4):334-8. ISSN: 1348-4400. <https://doi.org/10.1262/jrd.2013-038>

SEDAGHAT B, Hajjaran H, Sadjjadi FS, Heidari S, Sadjjadi SM. 2021. Proteomic 1089-8646 through optimizing protein extraction. *BMC Res Notes.* 14(1):22. ISSN: 1756-0500. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-05433-3>

SETIAWAN R, Priyadarshana C, Miyazaki H, Tajima A, Asano A. 2021. Functional difference of ATP-generating pathways in rooster sperm (*Gallus gallus domesticus*). *Anim Reprod Sci.* 233:106843. 233. ISSN: 1873-2232. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106843>

ZHONG TY, Ling L, Feng Z, Zhen-He Z, Maxwell H, Ning Y, Zhuo-Cheng H. 2020. The transcriptome landscapes of ovary and three oviduct segments during chicken (*Gallus gallus*) egg formation. *Genomics.* 112(1):243-251. ISSN: 1089-8646. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.02.003>

[Errata Erratum](#)

<https://abanicoacademico.mx/revistasabanico-version-nueva/index.php/abanico-veterinario/errata>