

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

**EFEITO DO PLASMA RICO E POBRE EM PLAQUETAS NA
CONGELAÇÃO DO SÊMEN OVINO**

LUAN SITÓ DA SILVA

Botucatu, SP
Junho – 2024

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

**EFEITO DO PLASMA RICO E POBRE EM PLAQUETAS NA
CONGELAÇÃO DO SÊMEN OVINO**

Tese apresentada junto ao programa
de Biotecnologia Animal para
obtenção do título de DOUTOR.

Luan Sitó da Silva
Orientadora: Profa. Dra. Eunice
Oba

Botucatu, SP
Junho – 2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Silva, Luan Sitó da.

Efeito do plasma rico e pobre em plaquetas na congelação
do sêmen ovino / Luan Sitó da Silva. - Botucatu, 2024

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
Botucatu

Orientador: Eunice Oba

Capes: 50504002

1. Carneiro. 2. Criopreservação. 3. Espermatozoides.
4. Plasma rico em plaquetas.

Palavras-chave: Carneiro; Criopreservação; Espermatozoide;
PRP.

Autor: Luan Sitó da Silva

Título: EFEITO DO PLASMA RICO E POBRE EM PLAQUETAS NA CONGELAÇÃO DO SÊMEN OVINO

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Eunice Oba

Presidente e orientadora

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ, UNESP – Botucatu/SP

Dra. Camila de Paula Freitas Dell’Aqua

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ, UNESP – Botucatu/SP

Prof. Dr. Antonio Campanha Martinez

Membro

Departamento de Medicina Veterinária, UEM, Umuarama/PR

Prof. Dr. Paulo Fernandes Marcusso

Membro

Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, UNESP – Botucatu/ SP

Prof. Dr. Edjalma Rodrigues da Silva Junior

Membro

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, FMVA, UNESP - Araçatuba/SP

AGRADECIMENTOS

Agradeço grandiosamente a Deus pelas infinitas bênçãos e bondade, que possibilitaram a realização deste doutorado.

À minha família, pelo apoio sem fim e amor incondicional. Não existem palavras que possam agradecer tudo o que fazem por mim. Pai e mãe, vocês são meus exemplos. Aos meus irmãos, com quem tenho um amor infinito, amo vocês.

À minha namorada Renata, que me apoiou, deu dicas e incentivou durante todo o processo.

Aos membros da comissão avaliadora de qualificação, Professora Dra. Laíza Sartori de Camargo e Professor Dr. Paulo Fernandes Marcusso, por disponibilizarem seu tempo para contribuir com o meu aprendizado e crescimento profissional.

À Dra. Camila de Paula Freitas Dell'Aqua e ao Professor Dr. Edjalma Rodrigues da Silva Junior, por participarem da defesa da tese, prontamente aceitando participar de um momento tão importante e por contribuírem muito para a melhoria do trabalho.

Ao meu orientador de graduação e mestrado, Professor Dr. Antonio Campanha Martinez, que também aceitou participar da banca de defesa de doutorado. Se este título está sendo alcançado, uma grande parte eu devo a ele. Foi ele que me perguntou no segundo ano de faculdade qual era meu grande sonho e, quando eu disse, falou: “então vamos te preparar para que isso aconteça”. Muito obrigado por me incentivar, ajudar e me “polir” (como ele sempre diz). Minha eterna gratidão!

À minha orientadora de doutorado, Professora Dra. Eunice Oba. Agradeço por esses anos de parceria, ensinamentos e por não ter medido esforços para que tudo dentro da UNESP acontecesse. Sou infinitamente grato por cada oportunidade que me deu, por ter confiado e, acima de tudo, acreditado naquilo que eu pretendia. Não existem palavras para expressar minha gratidão a ela. Mais uma vez, MUITO OBRIGADO!

Aos amigos de pós-graduação, que com certeza levarei para a vida: Estevam, Giovana, Beatriz (Sky), Rogério, Luiz, Flávio (Zirda), Mariana Polesso, Lucas Canuto, Camila Trinque, Carolina Lobo (Carol), Paula e Zara. Obrigado por tornarem essa fase mais leve.

Aos meus amigos da república, em especial ao Lucas Monteiro, que me concedeu uma vaga na república em 2021, e ao Gustavo Rosa, que me fizeram companhia e me auxiliaram no começo e durante todo o processo. Ambos que hoje considero como irmãos.

Aos atuais parceiros de república, Xico e Guilherme, pelas conversas e parcerias nesse pouco tempo que convivemos.

Meus mais sinceros agradecimentos a cada um que indiretamente também me ajudou durante todo este tempo de doutorado e na execução deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“A pressão é um privilégio – só vem para aqueles que a conquistam”

(King, 2008).

RESUMO

SITÓ-SILVA, L. EFEITO DO PLASMA RICO E POBRE EM PLAQUETAS NA CONGELAÇÃO DO SÊMEN OVINO. Botucatu – SP. 2024, 84p. Defesa (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um concentrado de plaquetas com uma quantidade acima da encontrada no sangue. A utilização do PRP teve início na década de 70, inicialmente em transfusões para tratar trombocitopenia. Na medicina veterinária, destacou-se na dermatologia (tratamento de feridas), oftalmologia e medicina esportiva em equinos. Na reprodução veterinária, começou com o tratamento de endometrite crônica em éguas, levando a um aumento da recuperação embrionária e uma maior taxa de fertilidade. Também existem relatos no tratamento de endometrite bovina e em vacas repetidoras de cio. No campo da andrologia veterinária, o uso de PRP é recente. Inicialmente, foi aplicado no sêmen humano, tanto em amostras frescas como criopreservadas e, posteriormente, em caprinos e búfalos.. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do plasma rico em plaquetas quando adicionado ao meio diluente de criopreservação de sêmen ovino. Foram utilizados oito carneiros, em idade reprodutiva. Dois ejaculados/carneiro foram colhidos por vagina artificial. O sêmen foi avaliado por meio do sistema computadorizado de sêmen (CASA) e dividido em cinco tratamentos: Controle (diluente comercial puro – BotuBov ®); PRP10 (diluente acrescido de 10 milhões de plaquetas/mL); PRP20 (diluente acrescido de 20 milhões de plaquetas/mL); PRP40 (diluente acrescido de 40 milhões de plaquetas/mL) e PLA (diluente suplementando com plasma pobre em plaquetas- PPP, no mesmo volume do grupo PRP40). O sêmen foi congelado e após a descongelação foi avaliado novamente para os parâmetros de cinética espermática e avaliação por citometria de fluxo. O PRP e o PPP demonstraram ser seguros quando adicionados ao meio diluente para criopreservação do sêmen ovino. Foi possível observar melhorias nos parâmetros de integridade da membrana plasmática e do acrossomo ($P=0,02$), células mais estáveis ($P=0,03$) e maior produção de H_2O_2 ($P=0,05$). Conclui-se que, o PRP e o PPP são seguros, bem como alternativas viáveis para criopreservação do sêmen ovino, devido as suas atividades antioxidantes.

Palavras-chave: carneiro, criopreservação; espermatozoide, PRP

ABSTRACT

SITÓ-SILVA, L. **EFFECT OF PLATELET-RICH AND PLATELET-POOR PLASMA ON THE FREEZING OF SHEEP SEMEN.** Botucatu – SP. 2024, 84p. Thesis (Doctorate) – Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Campus Botucatu, São Paulo State University.

Platelet-rich plasma (PRP) is a platelet concentrate with a quantity above that found in blood. The use of PRP began in the 1970s, initially in transfusions to treat thrombocytopenia. In veterinary medicine, it has been prominent in dermatology (wound treatment), ophthalmology, and sports medicine in horses. In veterinary reproduction, it started with the treatment of chronic endometritis in mares, leading to an increase in embryo recovery and a greater fertility rate. There are also reports of its use in the treatment of bovine endometritis and in repeat breeding cows. In the field of veterinary andrology, the use of PRP is recent. Initially, it was applied to human semen, both in fresh and cryopreserved samples, and later in goats and buffaloes. However, no records of its application in sheep were found in the literature reviewed. The objective of this study was to evaluate the effects of platelet-rich plasma when added to the cryopreservation medium of sheep semen. Eight rams of reproductive age were used. Two ejaculates per ram were collected using an artificial vagina. The semen was evaluated using a computerized semen analysis system (CASA) and divided into five treatments: Control (pure commercial diluent – BotuBov®); PRP10 (diluent supplemented with 10 million platelets/mL); PRP20 (diluent supplemented with 20 million platelets/mL); PRP40 (diluent supplemented with 40 million platelets/mL); and PLA (diluent supplemented with platelet-poor plasma - PPP, in the same volume as the PRP40 group). The semen was frozen and after thawing, it was re-evaluated for sperm kinetic parameters and flow cytometry assessment. PRP and PPP proved to be safe when added to the diluent medium for sheep semen cryopreservation. Improvements were observed in the parameters of plasma membrane and acrosome integrity ($P=0.02$), more stable cells ($P=0.03$), and higher H_2O_2 production ($P=0.05$). It is concluded that PRP and PPP are safe and viable alternatives for sheep semen cryopreservation due to their antioxidant activities.

Keywords: cryopreservation; PRP, ram, spermatozoa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espermatozoide e seus componentes.....	15
Figura 2 - Plaquetas e seus receptores, plaqueta ativada e substâncias secretadas pelos grânulos densos e alfa (α).....	23
Figure 3 - Total and progressive motility (%) post-thaw (0h) and after 3 hours of incubation at 37°C (thermotolerance test - TTR).....	81
Figure 4 - Flow cytometry analysis. A. Percentage of cells with intact plasma and acrosomal membrane; B. Percentage of cells with membrane stability; C. Percentage of cells with high O ₂ production; D. Concentration of H ₂ O ₂ in damaged cells, measured by the intensity of fluorescence emitted by the cells (UA, arbitrary units). *statistical difference between groups.....	81

LISTA DE TABELAS

Table 1 - Mean $\pm$ standard error of post-thaw seminal parameters evaluated by CASA with or without the addition of autologous platelet-rich plasma (PRP) in sheep	76
Table 2 - Mean $\pm$ standard error of post-thaw seminal parameters incubated for 3 hours at 37°C and evaluated by CASA with or without the addition of autologous platelet-rich plasma (PRP) in sheep	77
Table 3 - Mean $\pm$ standard error of seminal parameters (CASA) post-thaw with or without the addition of autologous platelet-rich plasma (PRP) for the 4 sheep that showed differences in flow cytometry analyses.	78
Table 4 - Mean $\pm$ standard error of the evaluations performed by flow cytometry for plasma membrane and acrosome integrity, plasma membrane stability, and mitochondrial potential of all sheep (n=8) and the selected animals (n=4)	79
Table 5 - Mean $\pm$ standard error of the evaluations performed by flow cytometry for superoxide (O ₂ •-) production in the mitochondrial matrix and intracellular hydrogen peroxide production of all sheep (n=8) and the selected animals (n=4)	80

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	12
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 A célula espermática	15
2.2 Efeitos de baixas temperaturas sob o espermatozoide	16
2.2.1 O espermatozoide ovino	16
2.3 espécies reativas de oxigênio (erO).....	17
2.4 componente de um diluente seminal	17
2.4.1 Crioprotetor penetrante	17
2.4.2 Crioprotetor não-penetrante.....	18
2.4.3 Tampão	18
2.4.4 Açúcares	19
2.4.5 Antibióticos.....	19
2.4.6 Antioxidantes no diluente seminal para ovinos	20
2.5 O sangue.....	22
2.5.1 A plaqueta.....	22
2.6 O plasma rico em plaquetas	23
2.6.1 Constituição do Plasma rico em plaquetas	23
2.6.2 Método de preparo e classificação.....	24
2.6.3 Anticoagulante.....	25
2.6.4 Ativação plaquetária	25
2.6.6 O plasma rico em plaquetas na medicina veterinária	27
2.6.7 Plasma rico em plaquetas e a reprodução da fêmea	27
2.6.8 Plasma rico em plaquetas e a reprodução do macho	29
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	31
4. HIPÓTESE E OBJETIVOS	32
4.1 Hipótese.....	32
4.2 Objetivo Geral.....	32
4.3 Objetivos específicos:	32
5. REFERÊNCIAS	33
Capítulo 2	46

Abstract	48
1. INTRODUCTION	49
2. MATERIAL AND METHODS	51
2.1 Experimentation Location	51
2.2 Animal Selection	51
2.3 Semen Collection and Analysis	52
2.4 Hematological Evaluation	53
2.4.1 Hemogram	53
2.4.2 Biochemical Analyses	53
2.5 Obtaining Autologous Platelet-Rich Plasma (PRP)	54
2.6 Semen Freezing	54
2.6.1 Semen Dilution	54
2.7 Post-Thaw Evaluation	55
2.8 Sperm Evaluation by Flow Cytometry	55
2.8.1 Plasma Membrane and Acrosome Integrity	56
2.8.2 Plasma Membrane Destabilization, Mitochondrial Membrane Potential, and Superoxide Production	56
2.8.3 Intracellular Hydrogen Peroxide Production	56
2.9 Statistical Analysis	57
3. RESULTS	58
4. DISCUSSION	60
5. CONCLUSION	65
6. REFERENCES	66

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A rebanho ovino no mundo é de aproximadamente 1,2 bilhão de cabeças, sendo a China detentora do maior rebanho do mundo, com cerca de 171,8 milhões de cabeças, seguida da Índia e Austrália (IWTO, 2022). A ovinocultura no Brasil tem demonstrado um crescimento, embora pequeno, nos últimos anos, chegando a 2022 a rebanho de aproximadamente 21,5 milhões de cabeças. A Bahia é o maior estado produtor do país, e os animais estão concentrados na região Nordeste e na região Sul, principalmente no estado do Rio Grande do Sul (IBGE, 2022).

A inseminação artificial é datada de mais de 100 anos, começando com animais de produção. No entanto, seu principal foco inicial foram as biotecnologias do sêmen, especialmente os meios diluidores. Foi somente na década de 1930 que maiores pesquisas foram implementadas, e o sêmen fresco e diluído passou a ser utilizado na ovinocultura de forma comercial e em larga escala (IVANOV, 1907, 1912; SALAMON; MAXWELL, 2000).

Para a utilização da inseminação em larga escala, foi necessário otimizar os reprodutores, e o processo de congelação de doses de sêmen tornou-se essencial. Em 1937, houve o primeiro relato da congelação de sêmen ovino, com a utilização do glicerol como crioprotetor, porém testado em diversas espécies de mamíferos, obtendo sucesso (BERNSTEIN; PETROPAVLOVSKY, 1937; SALAMON; MAXWELL, 2000).

Há muitos anos, tem-se buscado melhorias das taxas de concepção com sêmen congelado na ovinocultura. Testes realizados na década de 1950 apresentaram baixos índices de fertilidade (5%) (BLACKSHAW; EMMENS, 1953; DAUZIER, 1956; SALAMON; MAXWELL, 2000). Desde então, houve uma melhora significativa em valores numéricos. Atualmente, é considerado esperado que a taxa de fertilidade com sêmen congelado em ovinos seja normalmente inferior a 50% quando realizado por laparoscopia, uma técnica dispendiosa e que requer experiência veterinária (MASOUDI et al., 2017). No entanto, as taxas de prenhez podem variar, podendo alcançar até 75% (FAIGL et al., 2012; GIBBONS et al., 2019).

Para melhorar as taxas de prenhez nesta espécie, foram realizados testes com antioxidantes e meios diluentes contendo diferentes crioprotetores (MASOUDI et al., 2017; CANUTO et al., 2022). No entanto, a motilidade pós-descongelação dos espermatozoides ovinos permanece baixa, mesmo utilizando crioprotetores externos de

origem vegetal ou animal. Portanto, métodos para aprimorar a qualidade do sêmen ovino após a criopreservação precisam ser estudados.

As plaquetas são um dos componentes do sangue total que, quando em concentração maior do que normalmente encontrada na corrente sanguínea da espécie (geralmente de 3 a 7 vezes mais), passa a ser chamado de plasma rico em plaquetas – PRP (ZHU et al., 2013). Na espécie ovina a concentração normal no sangue é de aproximadamente 400.000 plaquetas/ μ L, podendo variar de 250-750.000/ μ L (SEIXAS et al., 2021). Essas plaquetas possuem grânulos citoplasmáticos capazes de armazenar citocinas, fatores de crescimento, proteínas, mediadores, enzimas e minerais (MCNICOL; ISRAELS, 1999; APPEL et al., 2002; MARX, 2004; LAŠKAJ et al., 2009; CASTILLO et al., 2011; MAGALON et al., 2014; BADER et al., 2020;).

Os primeiros relatos sobre o uso de PRP remontam aos anos 90 e ao início dos anos 2000, com sua aplicação principalmente em enxertos ósseos e tratamentos dentários (FIJNHEER et al., 1990; MARX et al., 1998; DUGRILLON et al., 2002; OKUDA et al., 2003). Na medicina veterinária, mais precisamente na reprodução animal, sua primeira utilização foi para o tratamento de endometrite em éguas (WOODWARD; TROEDSSON, 2015; REGHINI et al., 2016). Somente recentemente é que o PRP começou a ser empregado nas biotecnologias de sêmen, inicialmente relatado no sêmen humano (YAN et al., 2021) e posteriormente em bodes (ALCAY et al., 2021), búfalos (EL-SHERBINY et al., 2022) e coelhos (ABDULLA; REBAI; AL-DELEMI, 2022).

Apesar de diversos antioxidantes e suas combinações já terem sido testados, a utilização do PRP na criopreservação destaca-se devido aos seus fatores de crescimento, proteínas e metabolitos liberados pelas plaquetas, mostrando-se como uma opção promissora. A capacidade do PRP de auxiliar os espermatozoides durante o processo de criopreservação, aumentando a motilidade pós-descongelção, tem o potencial de aprimorar a taxa de fertilidade das inseminações. Isso pode tornar a inseminação artificial com sêmen congelado mais rentável e viável para aplicação nas propriedades dedicadas à ovinocultura, especialmente devido à relativa simplicidade do processo, que requer apenas duas centrifugações.

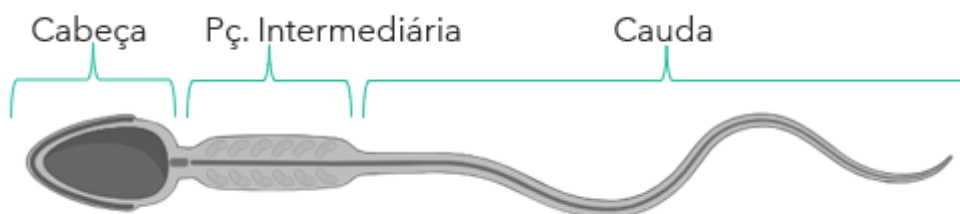
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CÉLULA ESPERMÁTICA

A célula espermática foi identificada pela primeira vez por volta de 1600 (SIKKA, 1996; SILVA; GADELLA, 2006). O espermatozoide é produzido por meio de um processo testicular chamado espermatogênese, que, no carneiro, dura cerca de 50 dias, desde a liberação da espermatogônia até o espermatozoide estar pronto na cauda do epidídimo (ORTAVANT, 1958).

O espermatozoide é dividido em três partes: cabeça, peça intermediária e cauda (Figura 1). A cabeça do espermatozoide é composta pelo material genético (núcleo - contém a cromatina condensada que carrega todas as informações genéticas) e pelo acrossomo, sendo este último originado do complexo de Golgi. O acrossomo recobre dois terços da cabeça e contém enzimas em seu interior capazes de hidrolisar a zona pelúcida do oócito, sendo essas enzimas liberadas durante o processo chamado de reação acrossomal (PESCH; BERGMANN, 2006; SILVA; GUERRA, 2012).

Figura 1 - Espermatozoide e seus componentes



Fonte: o autor (2024).

A peça intermediária é uma estrutura complexa que liga a cabeça à cauda do espermatozoide. Ele é caracterizado pela presença da bainha mitocondrial, que é responsável pela produção de energia necessária para o batimento da cauda do espermatozoide e as mitocôndrias estão dispostas em toda sua extensão, em hélices, ao redor dos elementos contráteis para alta flexibilidade (CARVALHO et al., 2002; PESCH; BERGMANN, 2006; MORTIMER, 2018). A cauda é a sua maior parte do espermatozoide e que não pode apresentar curvas ou dobras acentuadas. Possui fibras densas que podem ajudar a apoiar o axonema de flexão, sendo responsável pelo movimento do espermatozoide (MORTIMER, 2018).

O espermatozoide apresenta uma membrana plasmática composta por bicamadas lipídicas, os quais estão associados a uma grande quantidade de proteínas. Essa membrana reveste todo o espermatozoide e pode apresentar diferentes composições em cada região da célula espermática (TAPIA et al., 2012; (MORTIMER, 2018).

2.2 EFEITOS DE BAIXAS TEMPERATURAS SOB O ESPERMATOZOIDE

A primeira congelção de sêmen foi realizada em 1776 por Lazzaro Spallanzani (SPALLANZANI, 1776). Desde então, com os avanços e descobertas na utilização de crioprotetores que pudessem auxiliar o processo de criopreservação dos espermatozoides, e com um foco crescente desde o início do século XX, esse processo tem sido amplamente empregado não apenas em animais de interesse agropecuário, mas também em espécies ameaçadas de extinção (PESCH; BERGMANN, 2006).

Para o processo de criopreservação, é necessária suspensão do metabolismo dos espermatozoides (PESCH; BERGMANN, 2006). No entanto, durante esse procedimento, ocorrem estresses químicos, mecânicos e osmóticos, onde as principais alterações ocorrem durante a criopreservação seminal. O primeiro é a formação de cristais de gelo, que podem causar danos diretos às células espermáticas e o segundo envolve as concentrações de solutos e as alterações na pressão osmótica da fração descongelada (WATSON; DUNCAN, 1988; HAMMERSTEDT; GRAHAM; NOLAN, 1990; PEGG, 2002), porém independentemente de qualquer outro fator, o estresse físico da membrana plasmática durante este processo é o mais limitante (PESCH; BERGMANN, 2006).

2.2.1 O espermatozoide ovino

O espermatozoide ovino apresenta maior dificuldade na criopreservação devido à sua maior sensibilidade às concentrações de glicerol, pois aparentemente sua penetração é mais fácil nesta espécie (SALAMON; MAXWELL, 2000). Além disso, a membrana plasmática desse espermatozoide possui uma menor proporção de colesterol em relação aos fosfolipídeos, em comparação com outras espécies (SAHA; ASADUZZAMAN; BARI, 2022).

Os danos causados especificamente ao espermatozoide ovino durante o processo de criopreservação são principalmente de natureza ultraestrutural, ou seja, de ordem física (SALAMON; MAXWELL, 2000). Essas injúrias podem ocorrer em todas as partes e estruturas do espermatozoide, desde sua membrana plasmática e acrossomo até mesmo no seu axonema, ressaltando-se que, a motilidade costuma ser mais bem preservada do que a integridade morfológica nesse processo (SALAMON; MAXWELL, 2000), ou seja, mesmo que o espermatozoide esteja móvel ele pode apresentar injúrias.

2.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)

O metabolismo normal dos gametas produz espécies reativas de oxigênio (ERO) porém os espermatozoides são muito sensíveis a estes (BANSAL; BILASPURI, 2011). Quando a produção de ERO excede a capacidade intrínseca de regulação da sua quantidade, ou seja, há uma grande quantidade dessas espécies reativas, pode ocorrer um estresse oxidativo (TREMELLEN, 2008). Os espermatozoides de mamíferos produzem alguns como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH) e o radical hipoclorito (OHCL) (BANSAL; BILASPURI, 2011). Os EROs apresentam alto potencial reativo que quando ligados a outras moléculas presentes no ejaculado podem ser altamente tóxicas e causar danos estruturais e funcionais ao espermatozoide fazendo com que este perca sua função (LAMIRANDE; GAGNON, 1995; GUERIN; EL-MOUATASSIM; MÉNÉZO, 2001; AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005). Para isso antioxidantes são adicionados ao diluente seminal para evitar esses efeitos.

2.4 COMPONENTE DE UM DILUENTE SEMINAL

Os diluentes seminais, independentemente da espécie, devem apresentar pH, osmolaridade e capacidade de tamponamento adequados para proteger os espermatozoides de danos durante o processo de criopreservação (SALAMON; MAXWELL, 2000). Isso garante que o processo ocorra da melhor forma possível e, conseqüentemente, minimize os danos aos espermatozoides.

Geralmente, o diluente seminal possui componentes básicos que auxiliam na criopreservação dos espermatozoides, incluindo um crioprotetor penetrante, um não penetrante, um tampão, açúcares (fontes de energia), sais e antibióticos (EVANS; MAXWELL, 1987).

2.4.1 Crioprotetor penetrante

O glicerol é o principal crioprotetor interno utilizado na criopreservação de espermatozoides, atuando na redução da formação de gelo em temperaturas abaixo de zero sendo mais comum utilizada em ovinos (SALAMON; MAXWELL, 2000). A concentração de glicerol no diluente seminal varia de acordo com a espécie em questão, pois caso muito elevada pode ocasionar danos osmóticos e tóxicos, porém, em ovinos, concentrações entre 6 e 8% seriam o ideal (SALAMON; MAXWELL, 2000; PESCH; BERGMANN, 2006).

Outras opções de crioprotetores penetrantes incluem o etilenoglicol e o dimetilsulfóxido (DMSO). O etilenoglicol foi utilizado com o intuito de atravessar mais facilmente a membrana

plasmática do espermatozoide, uma vez que apresenta menor peso molecular do que o glicerol (MOORE et al., 2006; NAJAFI et al., 2017). Em ovinos ele se demonstrou uma opção, com seus resultados pós-descongelamento semelhantes ao do glicerol, o que não aconteceu com o DMSO que diminuiu os valores de cinética espermática dos carneiros avaliados no estudo (NAJAFI et al., 2017).

2.4.2 Crioprotetor não-penetrante

A gema de ovo é um dos tipos de crioprotetores não penetrantes mais comuns utilizados nos diluentes seminais. Acredita-se que a gema de ovo proteja os espermatozoides durante o choque causado pelo frio e o processo de congelamento/descongelamento, atuando na membrana plasmática (SALAMON; MAXWELL, 2000). Mais especificamente, a proteção durante o processo de criopreservação se dá por meio das lipoproteínas de baixa densidade presentes na gema de ovo que protegem a integridade dos fosfolípidos de membrana (CHELUCCI et al., 2015). Uma discussão que tem ganhado destaque nos últimos anos é a questão da biossegurança da gema de ovo nos diluentes seminais. Isso ocorre porque a gema de ovo pode carrear doenças, além de potencialmente aumentar a pré-capacitação e aglutinação dos espermatozoides, o que pode influenciar na fertilidade do sêmen (NAJAFI et al., 2014; MEHDIPOUR et al., 2016; NAJAFI et al., 2017).

Uma alternativa à gema de ovo é a lecitina de soja, um produto de origem vegetal que não apresenta diferenças significativas entre os lotes. Além disso, a lecitina de soja tende a ser mais controlada em termos de qualidade e não apresenta os mesmos problemas sanitários associados à gema de ovo (NAJAFI et al., 2014). Ainda não está muito claro como a lecitina de soja auxilia o espermatozoide durante a criopreservação, mas há especulações de que ela possa estar relacionada à substituição dos fosfolípidos da membrana plasmática e à redução do ponto de congelamento (CHELUCCI et al., 2015). Outra hipótese é que a lecitina de soja possa reduzir a formação de cristais de gelo intracelulares devido a uma película protetora formada ao redor do espermatozoide (ZHANG et al., 2009).

Os diluentes à base de leite desnatado também podem ser utilizados, e sua proteção acontece a partir das caseínas presentes (MEDEIROS et al., 2002), assim como essas proteínas do leite tamponam o pH do sêmen e podem quelar quaisquer íons de metais pesados protegendo a membrana plasmática.

2.4.3 Tampão

O ejaculado dos mamíferos, de modo geral, apresenta um pH em torno de 7,0 (HAHN; FAILING; WEHREND, 2019). No entanto, durante o metabolismo, principalmente na via

glicolítica para a produção de energia, esse pH pode diminuir, o que pode afetar a qualidade espermática (RIGAU et al., 1996). Para manter o pH estável, é comum o uso de um tamponante no diluente seminal, sendo o tris (hidroximetil) aminometano e o citrato os mais comuns (SALAMON; MAXWELL, 2000; GADEA, 2003; KAMAL et al., 2022). Uma outra função do citrato no diluente seminal seria para a quelação de cálcio que intracelular é alta principalmente em temperaturas abaixo de 17°C (HOLT, 2000).

2.4.4 Açúcares

Todas as células, incluindo os gametas, necessitam de energia durante o seu metabolismo (BUSTANI; BAIEE, 2021). O açúcar é uma forma de fornecer energia aos espermatozoides, e entre os açúcares, a glicose e a frutose são os mais comuns, mas pode-se encontrar a suplementação com galactose, xilose, lactose, trealose, maltose, sacarose, rafinose (SALAMON; MAXWELL, 2000; YILDIZ et al., 2000). A frutose parece ser a melhor opção, pois ajuda na manutenção da integridade da membrana, na motilidade e no vigor pós-descongelamento dos espermatozoides (CANTANHÊDE et al., 2018).

2.4.5 Antibióticos

Os machos são testados para doenças antes e durante a rotina de colheita de sêmen. No entanto, a avaliação de cada dose de sêmen individualmente é inviável. Por isso, a utilização de antibióticos no diluente seminal é exigida por lei, tanto em âmbito nacional quanto internacional (MORRELL; WALLGREN, 2014). É importante considerar que o ejaculado já pode estar contaminado até certo ponto, e o sêmen ainda pode ser contaminado durante sua manipulação (ALTHOUSE, 2008; MORRELL; WALLGREN, 2014).

O fato de concentrações elevadas de certos antibióticos serem tóxicas para os espermatozoides levou à adição de um coquetel, ou seja, vários agentes, para minimizar os efeitos adversos de cada um dos agentes (MORRELL; WALLGREN, 2014). As bactérias presentes no ejaculado ou que contaminam durante a manipulação do sêmen podem ser responsáveis pela capacitação precoce dos espermatozoides (KÖHN et al., 2009), diminuição da motilidade (ALTHOUSE; PIERDON; LU, 2008), aglutinação (MONGA; ROBERTS, 1994), assim como podem contaminar a fêmea inseminada, causando secreção vulvar, retorno ao estro (ALTHOUSE et al., 2000), endometrite, morte embrionária e até mesmo uma infecção sistêmica (MAES et al., 2008).

Os antibióticos mais utilizados incluem a estreptomicina, penicilina, lincomicina e espectinomicina (SALAMON; MAXWELL, 2000; MORRELL; WALLGREN, 2014). Além disso, existem pesquisadores que buscam formas de não utilizar antibióticos no diluente

seminal. Isso ocorre porque, principalmente em suínos e equinos, a inseminação pode ser realizada com sêmen em grandes volumes, o que pode contribuir para o desenvolvimento de resistência bacteriana (SCHULZE et al., 2020)

2.4.6 Antioxidantes no diluente seminal para ovinos

2.4.6.1 Vitamina C e E

A vitamina C, também chamada de ácido ascórbico, e a vitamina E (Tocoferol) são antioxidantes não enzimáticos encontrados no sêmen (AL-GUBORY; FOWLER; GARREL, 2010). A concentração de vitamina C no ejaculado é cerca de 10 vezes maior do que a encontrada no sangue total (AZAWI; HUSSEIN, 2013). A vitamina C possui o efeito de diminuir os danos causados ao DNA durante o processo de criopreservação (HUGHES et al., 1998) e a vitamina E ajuda na inibição da peroxidação lipídica (ALMEIDA; BALL, 2005).

Nos estudos em ovinos, a adição *in vitro* de 0,9mg/mL de vitamina C e 0,1mg/mL de vitamina E melhorou a motilidade pós-descongelação, aumentou a quantidade de espermatozoides vivos e diminuiu a quantidade de espermatozoides e acrossomas anormais. (ALMEIDA; BALL, 2005).

A vitamina C e a vitamina E já se demonstraram ser eficazes na melhoria da qualidade do sêmen, inclusive quando fornecidas oralmente na dieta (JAFAROGHLI et al., 2014; NARBONA et al., 2016). Elas podem melhorar a qualidade e a quantidade do sêmen, bem como aumentar as atividades antioxidantes do sêmen e a qualidade da membrana plasmática (YUE et al., 2010a).

2.4.6.2 Selênio

Não existem muitos estudos sobre a suplementação de selênio em ovinos, mas aparentemente seu efeito está relacionado ao aumento da atividade antioxidante por meio de enzimas como a glutathione peroxidase, o que leva à diminuição da quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) (IRVINE, 1996; KENDALL et al., 2000). Um dos primeiros estudos, datado dos anos 2000, utilizou selênio para melhorar a qualidade seminal em ovinos por meio de suplementação na forma de Bolus, e o produto utilizado continha outros componentes, como o zinco (KENDALL et al., 2000). Esse estudo obteve resultados promissores, como o aumento das atividades antioxidantes, melhoria dos parâmetros de cinética e qualidade da membrana espermática.

Aparentemente, o selênio é frequentemente utilizado na sua forma injetável e em combinação com algum outro componente, não sendo adicionado ao diluente seminal *in vitro*.

Quando combinado com vitamina E, também na forma injetável, observa-se uma melhoria nos parâmetros do ejaculado, que vão desde o volume até os valores de cinética, bem como na morfologia dos espermatozoides (MAHMOUD; ABDEL-RAHEEM; HUSSEIN, 2013).

2.4.6.3 Zinco

O zinco desempenha diversas funções no organismo, algumas das quais são especialmente importantes para a produção de espermatozoides. Ele auxilia na diferenciação e replicação celular (KENDALL et al., 2000), aumenta a produção diária de espermatozoides (UNDERWOOD; SOMERS, 1969), além de aumentar os níveis de hormônios sexuais (HAMBIDGE; CASEY; KREBS, 1986). Além disso, o zinco atua como antioxidante, reduzindo a presença de Eros (GAVELLA; LIPOVAC, 2009).

Em ovinos, um estudo que utilizou diferentes formas de suplementação de zinco não observou alterações nos hormônios reprodutivos, como a testosterona, ou em outros parâmetros, como a circunferência escrotal, cinética e morfologia espermática (PAGE et al., 2020).

2.4.6.4 Quercetina

A quercetina é um flavonoide com atividade antioxidante e pode apresentar uma capacidade antioxidante maior do que as vitaminas E e C (STOJANOVIĆ; SPRINZ; BREDE, 2001), com menor toxicidade (KYSELOVA et al., 2003). No entanto, a suplementação do sêmen ovino com até 20µm/mL levou à redução do potencial de membrana mitocondrial (SILVA et al., 2012). No entanto, outro estudo demonstrou que a quercetina em concentrações de 10 ou 20µm/mL melhora motilidade total, progressiva, integridade de membrana, bem como quando associada a 1mM de trifosfato de adenosina extracelular melhorou a fertilidade das ovelhas por inseminação laparoscópica (TAYYAB KHAN et al., 2023).

2.4.6.5 Coenzima Q10

A Coenzima Q10 (CoQ10) atua na membrana interna mitocondrial, auxiliando na produção de energia, e está presente em todas as células de mamíferos (AGARWAL; MAJZOUB, 2017; BENTOV et al., 2010). Outra função fundamental da CoQ10 é seu efeito antioxidante, que ajuda a eliminar radicais livres e, assim, a reduzir os danos causados pelo estresse oxidativo (WANG et al., 2022).

Quando adicionada ao sêmen ovino e este preservado sem congelar durante 5 dias, a concentração de 50µmol/L melhorou os parâmetros de cinética, bem como integridade de membrana e diminuíram a produção de EROs (WANG et al., 2022). Porém, na dose de 2 µM

suplementado em lecitina de soja ou gema ovo melhorou a qualidade da cinética espermática, integridade de membrana e atividade mitocondrial (MASOUDI; SHARAFI; SHAHNEH, 2019).

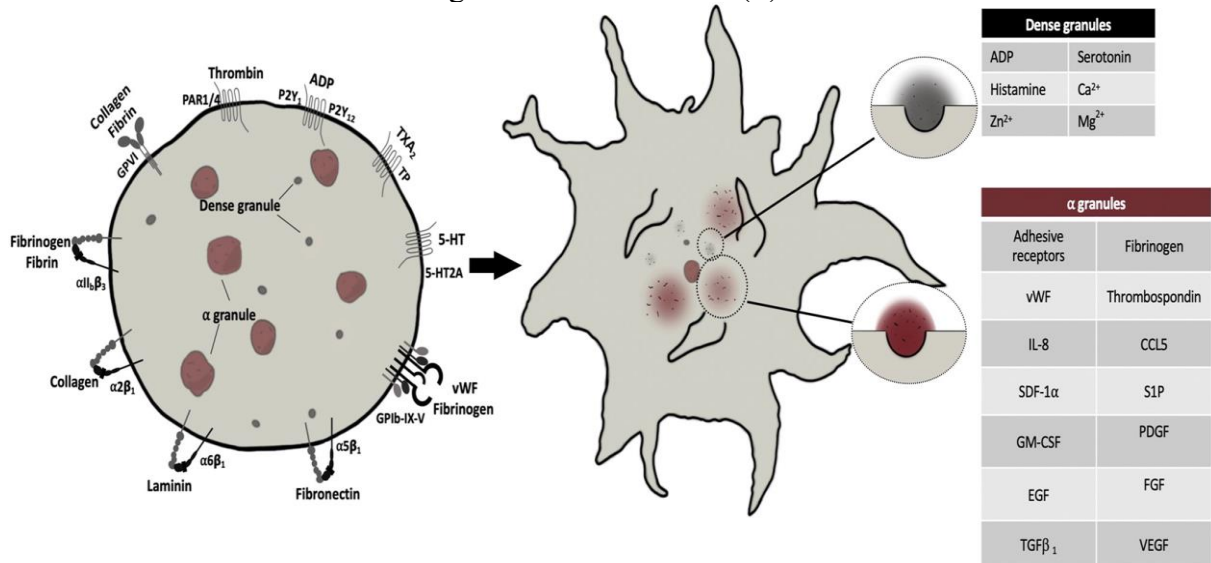
2.5 O SANGUE

O sangue representa cerca de 8% do peso corporal e é composto principalmente por eritrócitos, leucócitos, trombócitos (plaquetas) e plasma. Os eritrócitos são responsáveis pelo transporte de oxigênio, os leucócitos atuam na defesa do organismo, os trombócitos desempenham um papel crucial na hemostasia, e o plasma consiste em um meio intercelular rico em água, minerais, eletrólitos, vitaminas, proteínas, lipídios e carboidratos (SILVA, 2016).

2.5.1 A plaqueta

As plaquetas, também conhecidas como trombócitos, são células sanguíneas originárias de células-tronco pluripotentes da medula óssea. Elas apresentam formato discóide, não nucleadas e têm aproximadamente 2 μ m de diâmetro. As plaquetas desempenham um papel fundamental na hemostasia sanguínea (ARORA; ARORA, 2021). Nos ovinos, a quantidade basal de plaquetas no sangue varia de 250 a 750.000 plaquetas/ μ L (SEIXAS et al., 2021).

Figura 2 - Plaquetas e seus receptores, plaqueta ativada e substâncias secretadas pelos grânulos densos e alfa (α)



Fonte: ATKINSON; MARTIN; STURMEY (2021)

2.5.1.1 Funcionamento e composição das plaquetas

Os megacariócitos, as células responsáveis pela origem das plaquetas, formam grânulos que são transportados pelas plaquetas e funcionam como vesículas secretoras. Quando ativados, esses grânulos passam por exocitose, liberando seu conteúdo. Os grânulos estudados com mais frequência incluem os grânulos densos (que liberam conteúdo mais cedo em resposta a estímulos intensos), os grânulos alfas (que liberam conteúdo mais cedo em resposta a estímulos mais suaves) e os lisossomos (DHURAT; SUKESH, 2014; ALVES; GRIMALT, 2018; ARORA; ARORA, 2021).

2.6 O PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O plasma rico em plaquetas (PRP) vem sendo utilizado nas últimas cinco décadas de diversas formas (ARORA; ARORA, 2021). O termo foi criado para descrever o plasma com plaquetas acima da contagem periférica normal (ALVES; GRIMALT, 2018a). Suas primeiras utilizações datam da década de 1970, quando hematologistas o utilizaram para fazer transfusões em pacientes com trombocitopenia (ALVES; GRIMALT, 2018a). Na década de 1980, começou a ser empregado na ortodontia, quando foi possível verificar uma melhora na maturação do enxerto ósseo em implantes dentários, além de um aumento na densidade óssea trabecular (ANDIA; ABATE, 2013; ARORA; ARORA, 2021).

2.6.1 Constituição do Plasma rico em plaquetas

O PRP além de apresentar plaquetas acima dos valores normais do sangue, apresenta valores suprafisiológicos de fatores de crescimento, citocinas e proteínas (algumas com ação bactericida e fungicida) (BOS-MIKICH; OLIVEIRA; FRANTZ, 2018). As citocinas componentes do PRP podem ser pró ou anti-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-8, IL-13, IL-17, MMP-9, fator de necrose tumoral alfa e interferon alfa, sendo as pró-inflamatórias liberadas principalmente pelos neutrófilos que serão recuperados durante a produção do PRP (ARORA; ARORA, 2021). Além disso, os grânulos podem liberar íons de cálcio, histamina, serotonina e dopamina (BOS-MIKICH; OLIVEIRA; FRANTZ, 2018).

Dentre os componentes das plaquetas, os fatores de crescimento se destacam. Os principais e mais estudados são o fator de crescimento endotelial vascular (FCEV), fator de crescimento transformador (FCT), fator de crescimento derivado de plaquetas (FCDP), fator de crescimento epidérmico (FCE), fator de crescimento de fibroblastos 2 (FCF-2), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1), fator de crescimento de hepatócitos (FCH) (PIETRZAK; EPPLEY, 2005; LIN et al., 2015; ARORA; ARORA, 2021).

2.6.2 Método de preparo e classificação

Independentemente da literatura utilizada, os procedimentos básicos para a preparo do PRP são os mesmos. Inicia-se com a colheita de sangue na presença de um anticoagulante e, em seguida, a centrifugação imediata. Normalmente, são realizadas duas centrifugações para obter o PRP. A primeira é mais curta e suave, separando o sangue total em três camadas (o sobrenadante é o plasma, com os leucócitos e plaquetas na segunda camada e um pellet com glóbulos vermelhos). A segunda centrifugação, com maior força e tempo, separa ainda mais os leucócitos e obtém o concentrado de plaquetas (BOS-MIKICH; OLIVEIRA; FRANTZ, 2018).

Ainda existem possibilidades de preparação, sendo elas realizadas de maneira aberta ou fechada. O método aberto é realizado com o uso de tubos, pipetas e ponteiras, tornando-o mais suscetível à contaminação bacteriana. Por outro lado, o método fechado é realizado com o uso de kits comerciais, seguindo as recomendações do fabricante, e o produto não entra em contato com o meio ambiente, tornando-o um método asséptico (ALVES; GRIMALT, 2018a).

A variabilidade na contagem final de plaquetas depende da quantidade periférica normal do paciente. No entanto, só pode ser chamado de PRP quando a contagem final fica de 2 a 3 vezes maior do que a quantidade normal de plaquetas no sangue (BOS-MIKICH; OLIVEIRA; FRANTZ, 2018). No entanto, é importante ressaltar que a quantidade de plaquetas presentes após a segunda centrifugação para ser considerado um PRP é contraditória na literatura, existindo referências que aceitam entre 2 a 3 vezes (BOS-MIKICH; OLIVEIRA; FRANTZ,

2018), ou referencias que dizem ser 2 a 5 vezes (ALVES; GRIMALT, 2018a), chegando até 9 vezes (ICMS, 2020)

Após a segunda centrifugação, as plaquetas concentram-se no fundo do tubo (técnica aberta). Para a obtenção do PRP, é retirado 2/3 do sobrenadante (PPP - plasma pobre em plaquetas), e os componentes do fundo do tubo são considerados como PRP (REGHINI et al., 2016; ARORA; ARORA, 2021).

2.6.3 Anticoagulante

Um anticoagulante para obtenção e preservação do PRP é o ACD (ácido-citrato-dextrose), pois ele mantém a viabilidade das plaquetas e atende às suas necessidades metabólicas. O citrato fosfato dextrose pode ser considerado uma boa opção, uma vez que possui propriedades semelhantes ao ACD (LEI; XU; CHENG, 2019; ARORA; ARORA, 2021).

Outras opções de anticoagulantes incluem o citrato de sódio e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) no entanto, observou-se que ambos podem causar danos às plaquetas. O citrato de sódio altera a forma das plaquetas, enquanto o EDTA pode danificar suas membranas. No entanto, aparentemente, o EDTA é um quelante de cálcio mais eficaz entre os dois e pode ser uma opção melhor (GOLAŃSKI et al., 1996; DHURAT; SUKESH, 2014; ARORA; ARORA, 2021).

O uso da heparina não é indicado, uma vez que é considerada um ativador plaquetário, e sua utilização pode ser onerosa. Após o preparo do PRP, este pode ser mantido na sua forma não ativada por até 8 horas sem alterações de suas características (GOLAŃSKI et al., 1996; ARORA; ARORA, 2021).

2.6.4 Ativação plaquetária

A utilização de ativadores plaquetários no PRP é um tópico controverso (MARX, 2001; ARORA; ARORA, 2021). A ativação forma uma rede de fibrina, levando ao enredamento das células devido à polimerização tetravalente na rede de fibrina, resultando em degranulação e uma liberação lenta e constante dos fatores de crescimento (ICMS, 2020). Em estudos que não utilizam kits comerciais, geralmente, a ativação é realizada com trombina ou cálcio, os quais apresentam efeito de dose-resposta. Isso faz com que aproximadamente 70% dos fatores de crescimento sejam liberados nos primeiros 10 minutos após a ativação, e 100% estejam liberados na primeira hora (MARX, 2001; ARORA; ARORA, 2021). Poucos estudos comparam as metodologias de ativação ou não e seus efeitos na liberação dos fatores de crescimento (ARORA; ARORA, 2021).

A utilização da trombina bovina já foi refutada devido a preocupações com sua segurança biológica. Para contornar esses problemas, alternativas mais seguras têm sido consideradas, como a trombina humana recombinante, trombina autóloga ou peptídeo agonista do receptor de trombina (BOS-MIKICH; OLIVEIRA; FRANTZ, 2018; MIRON et al., 2019). Já o cloreto de cálcio demonstrou ser uma boa opção para a ativação, sendo utilizado em diversos trabalhos e mais seguro que a trombina (ARORA; ARORA, 2021; YAN et al., 2021; EL-SHERBINY et al., 2022).

Outra abordagem defende a não utilização de um ativador plaquetário, alegando que o colágeno presente nos tecidos moles atuaria como um ativador natural potente (MARLOVITS et al., 2004). Além disso, existe a sugestão que a sílica do tubo ou mesmo a agulha utilizada durante a aplicação do PRP atuariam como ativadores (MARQUES et al., 2015), mas não o ambiente em si (ARORA; ARORA, 2021).

2.6.5 Fisiologia do plasma rico em plaquetas

Nas diversas áreas de sua aplicabilidade o principal intuito da sua utilização são melhoria no reparo tecidual, principalmente devido aos produtos oriundos da sua secreção (citocinas, lisossomas e fatores de crescimento), bem como início da cascata hemostática pela ligação das proteínas presentes no plasma, revascularização e produção de um novo tecido conjuntivo (EVERTS et al., 2020).

Os grânulos alfa que é um dos tipos presente nas plaquetas tem como principal função o armazenamento dos fatores de crescimento, onde seu principal papel seria na angiogênese, a migração de células-tronco e a proliferação celular (ALVES; GRIMALT, 2018; COLLINS; ALEXANDER; BARKATALI, 2021). Os fatores de crescimento têm como principal função, se ligar aos receptores presentes na superfície das células e fazer a sinalização para as proteínas intracelulares citoplasmáticas para se ligarem a tirosina fosforilada (COLLINS; ALEXANDER; BARKATALI, 2021; KAWABATA, 1998).

Para o espermatozoide, os fatores de crescimento são os principais responsáveis pela melhora na qualidade pós-descongelamento, pois podem aumentar a motilidade do espermatozoide por meio de uma modulação dos receptores na peça intermediária, (CASTELLINI et al., 2019), devido a uma maior ativação mitocondrial e consequentemente maior produção de ATP (SUAREZ, 2008), . Outra função importante se dá pela proteção da integridade de membrana por meio de receptores TrKA da cabeça do espermatozoide, aumentando a sobrevivência do espermatozoide (LI et al., 2010).

Os fatores de crescimento ajudam principalmente a motilidade devido a uma maior estabilização da membrana mitocondrial produzindo mais energia (CHONG; MAIESE, 2004),

e o IGF-1 possui um efeito protetor da membrana mitocondrial e diminuição dos efeitos deletérios causados pelo estresse oxidativo e inativa as espécies reativas de oxigênio (SELVARAJU et al., 2016).

2.6.6 O plasma rico em plaquetas na medicina veterinária

Na medicina veterinária o PRP já vem sendo utilizado há um tempo, principalmente para o tratamento de feridas em cães (RABILLARD et al., 2009), cavalos (CARTER et al., 2003), e caprinos (AL-BAYATI et al., 2013). Os estudos estão aprofundados principalmente dentro das áreas de dermatologia e oftalmologia veterinária, bem como na medicina veterinária esportiva (TAMBELLA et al., 2018).

No contexto da dermatologia, um estudo envolvendo seis cães com feridas subagudas aplicou PRP em intervalos de 15 dias. Foi observada uma boa contração das bordas da ferida, além de uma reepitelização e cicatrização bem-sucedidas, sem efeitos adversos. (IACOPETTI et al., 2020).

Na oftalmologia veterinária, sua principal utilização é para úlcera de córnea (SHARUN et al., 2023). Um estudo envolvendo 16 gatos e 12 cães com úlcera de córnea avaliou biomarcadores de estresse oxidativo nas lágrimas dos animais. Observou-se que, em 50% dos cães, foi necessária uma segunda aplicação com intervalo de uma semana, enquanto em 50% dos gatos foram necessárias três aplicações com intervalo de uma semana para a remissão clínica da úlcera. Além disso, houve uma redução dos biomarcadores após a aplicação do PRP (FARGHALI et al., 2021).

In vivo, na medicina esportiva equina, os tratamentos se concentram em tendões, lesões ligamentares, articulações, o efeito sobre o líquido sinovial, consolidação óssea e cicatrização de feridas (GARBIN; LOPEZ; CARMONA, 2021).

2.6.7 Plasma rico em plaquetas e a reprodução da fêmea

A primeira utilização do PRP na reprodução não é datada de muito tempo atrás (2015). Um grupo chinês utilizou sua aplicação intrauterina em mulheres que apresentavam uma espessura endometrial incompatível com a gestação e que estavam tentando engravidar por meio da fertilização *in vitro*. Neste estudo, 5 mulheres participaram e receberam o PRP logo após o seu preparo, no 10º dia do ciclo de reposição hormonal e após o tratamento apresentaram endométrio acima de 7mm. Aparentemente, 4 tiveram sucesso na gestação e chegaram a termo, enquanto uma das mulheres abortou (CHANG et al., 2015a). Outros estudos também utilizaram o PRP como método para espessamento endometrial, demonstrando ser uma opção para esse tipo de caso (TANDULWADKAR et al., 2017; ZADEHMODARRES et al., 2017).

Uma outra opção de uso do PRP, ainda restrita à reprodução humana, é a aplicação de PRP intraovariano em mulheres com baixa contagem de folículos antrais ou na menopausa, demonstrando que o PRP, quando aplicado no ovário, pode levar a alterações nos níveis sanguíneos de FSH e AMH (SILLS et al., 2018), melhorar a produção de ovócitos, restaurar o ciclo menstrual e resultar em gravidez durante a menopausa (PANTOS et al., 2019; SFAKIANOUDIS et al., 2019), bem como melhorar o rendimento de oócitos e a qualidade embrionária, além de aumentar a quantidade de folículos antrais (CAKIROGLU et al., 2020). No entanto, na menopausa, maiores estudos precisam ser realizados, pois a maioria dos relatos da literatura são relatos de caso e não estudos controlados (KHEIL; BAHSOUN; SHARARA, 2022).

Outra opção é o uso do PRP para tratamento de falha recorrente na implantação embrionária, onde uma infusão intrauterina de PRP realizada 24 a 48 horas antes da transferência de embriões congelados e descongelados pode resultar em uma melhor taxa de implantação e, conseqüentemente, em uma maior taxa de gravidez (FARIMANI et al., 2017; MEHRAFZA et al., 2019; NAZARI et al., 2020).

Na medicina veterinária, a primeira utilização aparente do PRP na reprodução equina ocorreu na UNESP – Botucatu (REGHINI et al., 2016). O PRP foi usado para tratar a endometrite crônica degenerativa em éguas. Treze éguas foram tratadas com uma infusão de PRP após a inseminação artificial, e foi observada uma redução significativa na resposta inflamatória. Houve uma redução na quantidade de células polimorfonucleares no lúmen uterino e uma diminuição do líquido acumulado após a inseminação e seus benefícios já foram suportados posteriormente (SEGABINAZZI et al., 2017; ANDINO et al., 2023).

Outras aplicações bem-sucedidas do PRP na reprodução equina incluem a melhoria da recuperação embrionária, maiores chances de prenhez (SEGABINAZZI et al., 2021), incluindo um aumento de 75% na taxa de prenhez de éguas anteriormente consideradas estéreis (CARLUCCIO et al., 2020), e melhora da modulação inflamatória em éguas com subfertilidade (PASCH; SCHMIDT; KING, 2021).

Na bovinocultura, o primeiro estudo sobre a utilização do PRP na endometrite bovina foi realizado em 2016. Os testes *in vivo* e *in vitro* obtiveram resultados promissores, e os autores sugeriram a utilização do PRP como uma opção para a terapia regenerativa do endométrio bovino (MARINI et al., 2016), pois segundo seus resultados, houve uma redução dos fatores pró-inflamatórios, além de supor que o PRP aumente os receptores de progesterona nos tecidos uterinos. Além disso, quando utilizado em vacas repetidoras de cio, 48 horas após a inseminação

artificial, foi possível observar um incremento na taxa de prenhez das vacas tratadas com PRP (LANGE-CONSIGLIO et al., 2015).

Na fertilização *in vitro* de embriões mostraram que a substituição do soro fetal bovino e a adição de 5% de PRP podem levar a uma maior taxa de conversão de blastocistos quando comparado a adição de 10% (LANGE-CONSIGLIO et al., 2015). Em 1992, houve um estudo sobre a utilização de um dos principais fatores de crescimento liberados pelo PRP, o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (FCDP), para a produção *in vitro* de embriões. Foi possível observar que esse fator é capaz de sinalizar o desenvolvimento embrionário controlado durante o estágio de 8 células (LARSON; IGNOTZ; CURRIE, 1992).

A adição do PRP no meio de maturação não apresenta um efeito benéfico, porém 5% no meio de cultura auxilia na quantidade e qualidade dos embriões (RAMOS-DEUS et al., 2020). Na maturação oocitária de cabras, foi observado um efeito positivo, e não foram identificados efeitos negativos na taxa de clivagem e na criotolerância dos embriões quando comparado ao soro fetal bovino (MOULAVI et al., 2020).

2.6.8 Plasma rico em plaquetas e a reprodução do macho

Não existem muitos relatos na literatura sobre a utilização do PRP na reprodução masculina, tanto em humanos quanto em animais. Os estudos em seres humanos têm focado principalmente na disfunção erétil (EPIFANOVA et al., 2020). No entanto, em ratos com infertilidade induzida, quando o PRP foi aplicado em dose única intratesticular, foi possível verificar um aumento na concentração espermática, bem como na motilidade e no comprimento da cauda dos espermatozoides do grupo tratado, além de um aumento nos níveis de testosterona (DEHGHANI et al., 2019).

Nas biotecnologias da reprodução, o PRP parece atuar como antioxidante. Os parâmetros espermáticos de humanos na presença de H₂O₂ são preservados quando o PRP está presente, principalmente na concentração de 2%. Isso resulta em melhor motilidade total e progressiva, menor número de células positivas para EROs, menor fragmentação de DNA, vacuolização e células mortas (BADER et al., 2020).

Quanto a criopreservação de espermatozoides, o PRP auxilia na manutenção da motilidade total e progressiva pós-descongelamento (HERNÁNDEZ-CORREDOR et al., 2020). Em um estudo com sêmen humano criopreservado com adição de PRP, observou-se que a motilidade total foi significativamente melhor no grupo tratado com 5%. Além disso, houve

melhorias na viabilidade dos espermatozoides e na proteção contra o estresse oxidativo (YAN et al., 2021).

Na medicina veterinária, em ovinos foi possível ver uma melhora na motilidade total e progressiva, porém o estudo não avaliou a fundo os efeitos antioxidantes (HERNÁNDEZ-CORREDOR L et al., 2020). Em bodes, a adição de PRP em uma concentração de 20 milhões por mL na criopreservação mostrou benefícios na motilidade, integridade de membrana, integridade do acrossoma, função mitocondrial e redução na fragmentação do DNA, destacando seu papel como antioxidante (ALCAY et al., 2021). O mesmo efeito foi observado no sêmen criopreservado de búfalos que, quando adicionado PRP na concentração de 5% ao meio diluente de congelamento seminal, observou-se uma melhoria na motilidade total e progressiva, aumento da viabilidade e integridade de membrana, redução dos defeitos acrossômicos e anormalidades totais. Além disso, apresentou um aumento na capacidade antioxidante total e na atividade da superóxido dismutase (EL-SHERBINY et al., 2022). Em búfalos, maiores concentrações (15%) também resultaram em melhores resultados em motilidade total, progressiva, viabilidade, membrana plasmática e acrossomal, além disso, foi demonstrado ser uma boa opção para touros considerados subfêrteis. (ALMADALY et al., 2023).

Estudos recentemente publicados demonstraram que para bodes, concentrações de 10% são melhores para os parâmetros seminais (motilidades e integridades de membrana) (SALAMA et al., 2024a), já em ovinos da raça Ossimi, concentrações de 5% seriam as mais interessantes para manter os parâmetros espermáticos com maior qualidade e quantidade (SALAMA et al., 2024b).

Recentemente, foi realizada a aplicação intratesticular de PRP em bodes, seguida pela avaliação dos parâmetros seminais ao longo de 10 semanas (KASHKOOL; AL-DELEMI, 2023). Os resultados mostraram um aumento na concentração de espermatozoides, na motilidade e na melhoria da morfologia espermática nos grupos tratados em comparação com o grupo controle. No entanto, algumas lacunas, como a falta de informações sobre a localização e o método de aplicação do PRP, além de ter envolvido a colheita de sêmen por eletroejaculação, o que pode ter impacto na qualidade seminal fizeram falta no estudo

2.6.8.1 Teste de fertilidade com espermatozoide criopreservados com plasma rico em plaquetas

Para o teste de fertilidade com sêmen congelado na presença de alta quantidade de plaquetas, os espermatozoides foram testados na fertilização in vitro (EL-SHERBINY et al., 2022). Neste estudo, a concentração de PRP que se mostrou mais eficaz foi aquela previamente

determinada nos experimentos anteriores com parâmetros espermáticos (5%). Os resultados revelaram uma taxa maior de fertilização dos oócitos, uma redução na ocorrência de polispermia e, adicionalmente, o grupo tratado apresentou uma taxa superior de clivagem e formação de blastocistos.

Em búfalos foi testado o sêmen congelado-descongelado para a inseminação artificial de búfalas pré-sincronizadas, onde demonstrou que, altas concentrações de PRP (15%) podem ser benéficas para a fertilidade *in vivo* e que, quando o touro é considerado como subfértil, a utilização do PRP faz sua fertilidade ser semelhante a de touros considerados férteis, demonstrando ser uma opção não touros férteis ((ALMADALY et al., 2023).

Recentemente a fertilidade também foi testada em cabras e ovelhas inseminadas com sêmen na presença de PRP. Em cabras, foi possível observar que houve um aumento na taxa de concepção de nascimento conforme aumentava-se a concentração de PRP no sêmen, com a melhor taxa observada na presença de 10% de PRP (SALAMA et al., 2024a). Já em ovinos, as melhores taxas foram observadas quando o sêmen estava na presença de somente 5% de PRP, tanto quando o sêmen utilizado para a inseminação era congelado-descongelado, quanto na ocasião que o sêmen fresco foi suplementado com 5% de PRP e logo em seguida realizada a inseminação intra-cervical profunda (SALAMA et al., 2024b).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ovinocultura ainda apresenta uma grande demanda por melhorias nas biotecnologias para que possam ser aplicáveis a campo, tornando cada estratégia de melhoria do rebanho mais viável e, conseqüentemente, mais aceitável por parte do produtor. Assim, a melhora na qualidade do sêmen descongelado de forma econômica se torna plausível.

O plasma rico em plaquetas pode ser uma opção que vem se destacando não só nas biotecnologias aplicadas à reprodução da fêmea, mas também do macho. Inicialmente utilizado em humanos, cada vez mais está sendo empregado na reprodução animal, com resultados promissores. No entanto, como é uma técnica relativamente recente, mais estudos são necessários para torná-la mais replicável e para determinar qual espécie, dose e forma de aplicação são as mais adequadas.

4. HIPÓTESE E OBJETIVOS

4.1 HIPÓTESE

A hipótese deste estudo é que o plasma rico em plaquetas atuará como antioxidante e melhorará a qualidade espermática pós-descongelação em ovinos. Espera-se que isso resulte em melhorias não apenas nos parâmetros de cinética espermática, mas também em parâmetros específicos das células espermáticas avaliados por citometria de fluxo.

4.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do plasma rico em plaquetas em adição ao meio diluente de criopreservação de sêmen ovino.

4.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar a melhor concentração de plasma rico em plaquetas para a criopreservação do sêmen ovino;
- Avaliar o impacto do plasma rico em plaquetas nos parâmetros de cinética espermática;
- Investigar os efeitos antioxidantes do plasma rico em plaquetas na criopreservação do sêmen ovino.

5. REFERÊNCIAS

- ABDULLA, A. K.; REBAI, T.; AL-DELEMI, D. H. J. Protective Effects of Autologous Platelet-Rich Plasma (PRP) on the Outcome of Cryopreservation in Rabbit Sperm. **Cellular and Molecular Biology**, v. 68, n. 4, p. 113–121, 30 abr. 2022.
- ABOU-HAILA, A.; TULSIANI, D. R. P. Mammalian Sperm Acrosome: Formation, Contents, and Function. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 379, n. 2, p. 173–182, jul. 2000.
- AGARWAL, A. et al. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. **The World Journal of Men's Health**, v. 32, n. 1, p. 1, 2014.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, n. 1, p. 28, 14 dez. 2005.
- AGARWAL, A.; MAJZOUB, A. Role of Antioxidants in Assisted Reproductive Techniques. **The World Journal of Men's Health**, v. 35, n. 2, p. 77, 2017.
- AL-BAYATI, A. H. et al. Effects of Autologous Platelets Rich Plasma on Full-thickness Cutaneous Wounds Healing in Goats. **International Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 5, n. 6, p. 233–239, 2013.
- ALCAY, S. et al. Successful ram semen cryopreservation with lyophilized egg yolk-based extender. **Cryobiology**, v. 71, n. 2, p. 329–333, out. 2015.
- ALCAY, S. et al. Positive effect of autologous platelet rich plasma on Saanen buck semen cryopreservation in non-breeding season. **Cryobiology**, v. 103, p. 45–48, 1 dez. 2021.
- AL-GUBORY, K. H.; FOWLER, P. A.; GARREL, C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, n. 10, p. 1634–1650, out. 2010.
- ALMADALY, E. A. et al. Effect of platelet-rich plasma (PRP) on post-thaw quality, kinematics and in vivo fertility of fertile and subfertile buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. **Veterinary Research Communications**, v. 47, n. 1, p. 61–72, 22 jan. 2023.
- ALMEIDA, J.; BALL, B. A. Effect of α -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 87, n. 3–4, p. 321–337, jul. 2005.
- ALTHOUSE, G. Sanitary Procedures for the Production of Extended Semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. s2, p. 374–378, 9 jul. 2008.
- ALTHOUSE, G. C. et al. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. **Theriogenology**, v. 53, n. 5, p. 1167–1176, mar. 2000.
- ALTHOUSE, G. C.; PIERDON, M. S.; LU, K. G. Thermotemporal dynamics of contaminant bacteria and antimicrobials in extended porcine semen. **Theriogenology**, v. 70, n. 8, p. 1317–1323, nov. 2008.
- ALVES, R.; GRIMALT, R. A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification. **Skin Appendage Disorders**, v. 4, n. 1, p. 18–24, 2018.

ANDIA, I.; ABATE, M. Platelet-rich plasma: underlying biology and clinical correlates. **Regenerative Medicine**, v. 8, n. 5, p. 645–658, set. 2013.

ANDINO, A. P. et al. Mitigation of post breeding endometritis in mares treated with platelet rich plasma. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 125, p. 104688, jun. 2023.

APPEL, T. R. et al. Comparison of three different preparations of platelet concentrates for growth factor enrichment. **Clinical Oral Implants Research**, v. 13, n. 5, p. 522–528, out. 2002.

ARORA, G.; ARORA, S. Platelet-rich plasma—Where do we stand today? A critical narrative review and analysis. **Dermatologic Therapy**, v. 34, n. 1, p. e14343, 1 jan. 2021.

ATKINSON, L.; MARTIN, F.; STURMEY, R. G. Intraovarian injection of platelet-rich plasma in assisted reproduction: too much too soon? **Human Reproduction**, v. 36, n. 7, p. 1737–1750, 18 jun. 2021.

AZAWI, O. I.; HUSSEIN, E. K. Effect of vitamins C or E supplementation to Tris diluent on the semen quality of Awassi rams preserved at 5 °C. **Veterinary Research Forum**, v. 4, n. 3, p. 157–160, 2013.

BADER, R. et al. In vitro effect of autologous platelet-rich plasma on H₂O₂-induced oxidative stress in human spermatozoa. **Andrology**, v. 8, n. 1, p. 191–200, 1 jan. 2020a.

BADER, R. et al. *In vitro* effect of autologous platelet-rich plasma on H₂O₂-induced oxidative stress in human spermatozoa. **Andrology**, v. 8, n. 1, p. 191–200, 12 jan. 2020b.

BANSAL, A. K.; BILASPURI, G. S. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, p. 1–7, 2011.

BEER-LJUBIĆ, B. et al. Cholesterol concentration in seminal plasma as a predictive tool for quality semen evaluation. **Theriogenology**, v. 72, n. 8, p. 1132–1140, nov. 2009.

BENTOV, Y. et al. The use of mitochondrial nutrients to improve the outcome of infertility treatment in older patients. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 1, p. 272–275, jan. 2010.

BERNSTEIN, A. D.; PETROPAVLOVSKY, V. V. Effect of non-electrolytes on viability of spermatozoa. **Bjull. Eksp. Biol. Med.**, v. 3, n. 1, p. 41–43, 1937.

BERTOL, M. A. F. et al. Dois diluentes comerciais na criopreservação de espermatozoides do epidídimo de touros. **Ciência Rural**, v. 44, n. 9, p. 1658–1663, 1 set. 2014.

BLACKSHAW, A. W.; EMMENS, C. W. Survival of deep-frozen mammalian spermatozoa. **Vet. Record**, v. 65, p. 872, 1953.

BOS-MIKICH, A.; OLIVEIRA, R. DE; FRANTZ, N. Platelet-rich plasma therapy and reproductive medicine. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 35, n. 5, p. 753–756, 21 mar. 2018.

BRECHER, G.; CRONKITE, E. P. Morphology and Enumeration of Human Blood Platelets. **Journal of Applied Physiology**, v. 3, n. 6, p. 365–377, 1 dez. 1950.

BUSTANI, G. S.; BAIEE, F. H. Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. **Veterinary World**, p. 1220–1233, 20 maio 2021.

CAKIROGLU, Y. et al. Effects of intraovarian injection of autologous platelet rich plasma on ovarian reserve and IVF outcome parameters in women with primary ovarian insufficiency. **Aging**, v. 12, n. 11, p. 10211–10222, 5 jun. 2020.

CAMPOS, G. A. et al. Sodium Caseinate and Cholesterol Improve Bad Cooler Stallion Fertility. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 93, p. 103201, out. 2020.

CANTANHÊDE, L. F. et al. Use of alternative extender added of fructose aiming the cryopreservation of boar semen. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 55, n. 1, p. 1–10, 2 abr. 2018.

CANUTO, L. E. F. et al. Effect of quercetin or butylated hydroxytoluene on cooled or frozen-thawed ram sperm quality. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 43, n. 2, p. 841–854, 25 fev. 2022.

CARLUCCIO, A. et al. Platelet-rich plasma uterine infusion and pregnancy rate in barren mares with chronic degenerative endometritis. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 23, n. 3, p. 431–438, 4 out. 2020.

CARTER, C. A. et al. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 74, n. 3, p. 244–255, jun. 2003.

CARVALHO, O. F. DE et al. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 1, p. 33–38, jan. 2002.

CASTELLINI, C. et al. In vitro effect of nerve growth factor on the main traits of rabbit sperm. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 17, n. 1, p. 93, 12 dez. 2019.

CASTILLO, T. N. et al. Comparison of Growth Factor and Platelet Concentration From Commercial Platelet-Rich Plasma Separation Systems. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 39, n. 2, p. 266–271, 4 fev. 2011.

CAVALLO, C. et al. Platelet-Rich Plasma: The Choice of Activation Method Affects the Release of Bioactive Molecules. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–7, 2016.

CBRA, C. B. DE R. A. **Manual Para Exame Andrológico e Avaliação De Sêmen Animal**. 3ed. ed. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: [s.n.].

CELEGHINI, E. C. C. et al. Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 3, p. 536–543, jun. 2010.

CHANG, Y. et al. Autologous platelet-rich plasma promotes endometrial growth and improves pregnancy outcome during in vitro fertilization. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 1, p. 1286–1290, 2015a.

CHANG, Y. et al. Autologous platelet-rich plasma promotes endometrial growth and improves pregnancy outcome during in vitro fertilization. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 1, p. 1286, 30 jan. 2015b.

CHELUCCI, S. et al. Soybean lecithin-based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 83, n. 6, p. 1064–1074, abr. 2015.

CHONG, Z. Z.; MAIESE, K. Targeting WNT, protein kinase B, and mitochondrial membrane integrity to foster cellular survival in the nervous system. **Histol Histopathology**, v. 19, n. 2, p. 495–504, 2004.

COLLINS, T.; ALEXANDER, D.; BARKATALI, B. Platelet-rich plasma: a narrative review. **EFORT Open Reviews**, v. 6, n. 4, p. 225–235, abr. 2021.

DAUZIER, L. Quelques résultats sur l'insémination artificielle des brebis et des chèvres en France. **Proc. 3rd Int. Congr. Anim. Reprod. A.I.**, v. 3, p. 12–14, 1956.

DAVID, I. et al. Mass sperm motility is associated with fertility in sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 161, p. 75–81, out. 2015.

DEHGHANI, F. et al. The use of platelet-rich plasma (PRP) to improve structural impairment of rat testis induced by busulfan. **Platelets**, v. 30, n. 4, p. 513–520, 19 maio 2019.

DHURAT, R.; SUKESH, M. Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: A review and author's perspective. **Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery**, v. 7, n. 4, p. 189, 2014.

DUGRILLON, A. et al. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 31, n. 6, p. 615–619, dez. 2002.

EL-SHERBINY, H. R. et al. Addition of autologous platelet rich plasma to semen extender enhances cryotolerance and fertilizing capacity of buffalo bull spermatozoa. **Theriogenology**, v. 194, p. 104–109, 1 dez. 2022.

EPIFANOVA, M. V. et al. Platelet-Rich Plasma Therapy for Male Sexual Dysfunction: Myth or Reality? **Sexual Medicine Reviews**, v. 8, n. 1, p. 106–113, 1 jan. 2020.

EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Salamons' artificial insemination of sheep and goats**. Sydney: [s.n.].

EVERTS, P. et al. Platelet-Rich Plasma: New Performance Understandings and Therapeutic Considerations in 2020. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 20, p. 7794, 21 out. 2020.

FAIGL, V. et al. Artificial insemination of small ruminants — A review. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 60, n. 1, p. 115–129, 1 mar. 2012.

FARGHALI, H. A. et al. Corneal Ulcer in Dogs and Cats: Novel Clinical Application of Regenerative Therapy Using Subconjunctival Injection of Autologous Platelet-Rich Plasma. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, 18 mar. 2021.

FARIMANI, M. et al. Successful pregnancy and live birth after intrauterine administration of autologous platelet-rich plasma in a woman with recurrent implantation failure: A case report. **International Journal of Reproductive BioMedicine**, v. 15, n. 12, p. 803–806, 2017.

FIJNHEER, R. et al. Platelet activation during preparation of platelet concentrates: a comparison of the platelet-rich plasma and the buffy coat methods. **Transfusion**, v. 30, n. 7, p. 634–638, set. 1990.

FREITAS-DELL'AQUA, C. P. et al. Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen stallion spermatozoa. **Animal Reproduction**, v. 9, p. 941, 2012.

FREITAS-DELL'AQUA, C. P. et al. Superoxide anion is reduced in gradient selected cryopreserved stallion semen despite high mitochondrial potential. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 66, p. 57, 2018.

GADEA, J. Review: semen extenders used in the artificial insemination of swine. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 1, n. 2, p. 17, 1 jun. 2003.

GARBIN, L. C.; LOPEZ, C.; CARMONA, J. U. A Critical Overview of the Use of Platelet-Rich Plasma in Equine Medicine Over the Last Decade. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, 31 mar. 2021.

GAVELLA, M.; LIPOVAC, V. In vitro effect of zinc on oxidative changes in human semen. **Andrologia**, v. 30, n. 6, p. 317–323, 24 abr. 2009.

GIBBONS, A. E. et al. Technical recommendations for artificial insemination in sheep. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 4, p. 803–809, 2019.

GOLAŃSKI, J. et al. MOLECULAR INSIGHTS INTO THE ANTICOAGULANT-INDUCED SPONTANEOUS ACTIVATION OF PLATELETS IN WHOLE BLOOD - VARIOUS ANTICOAGULANTS ARE NOT EQUAL. **Thrombosis Research**, v. 83, n. 3, p. 199–216, ago. 1996.

GUERIN, P.; EL-MOUATASSIM, S.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, v. 7, n. 2, p. 175–189, 1 mar. 2001.

HAHN, K.; FAILING, K.; WEHREND, A. Effect of temperature and time after collection on buck sperm quality. **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 1, p. 355, 22 dez. 2019.

HAMBIDGE, K. M.; CASEY, C. E.; KREBS, N. F. Zinc. Em: W.D. MERTZ (Ed.). **Trace Elements in Human and Animal Nutrition**. Orlando: [s.n.]. v. 2p. 1–138.

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. 1–88, 1990.

HARTWIG, F. P. et al. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: An alternative for bad cooler stallions. **Theriogenology**, v. 81, n. 2, p. 340–346, jan. 2014.

HERNÁNDEZ-CORREDOR L et al. Effect of the incorporation of plasma rich of platelets on the spermatozoa physiology of ram semen. **Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research**, v. 9, n. 1, p. 34–38, 2020.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1–3, p. 3–22, ago. 2000.

HOSSAIN, MD. S. et al. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, n. 3, p. 406–419, 11 maio 2011.

HUGHES, C. M. et al. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. **Human Reproduction**, v. 13, n. 5, p. 1240–1247, 1 maio 1998.

IACOPETTI, I. et al. Autologous Platelet-Rich Plasma Enhances the Healing of Large Cutaneous Wounds in Dogs. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, 26 out. 2020.

IBGE, I. B. DE G. E E. **Rebanho de Ovinos (Ovelhas e Carneiros)**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/ovino/br>>. Acesso em: 17 out. 2023.

ICMS, T. I. C. M. S. **Guidelines for the Use of Platelet Rich Plasma**. Disponível em: <http://www.cellmedicinesociety.org/attachments/206_ICMS%20-%20Guidelines%20for%20the%20use%20of%20Platelet%20Rich%20Plasma%20-%20Draft.pdf>. Acesso em: 20 out. 2023.

IRMAK, G.; DEMIRTAŞ, T. T.; GÜMÜŞDERELIOĞLU, M. Sustained release of growth factors from photoactivated platelet rich plasma (PRP). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 148, p. 67–76, mar. 2020.

IRVINE, D. Glutathione as a treatment for male infertility. **Reviews of Reproduction**, v. 1, n. 1, p. 6–12, 1 jan. 1996.

IVANOV, I. I. De la fécondation artificielle chez les mammifères. **Arch. Sci. Bio. Inst. Imp. Méd. Exp.**, v. 12, p. 377–511, 1907.

IVANOV, I. I. **Artificial Fecondation of Domestic Animals**. Hannover : [s.n.].

IWTO, I. W. T. O. **World Sheep Numbers & Wool Production**. Disponível em: <<https://iwto.org/wp-content/uploads/2022/04/IWTO-Market-Information-Sample-Edition-17.pdf>>. Acesso em: 17 out. 2023.

JAFAROGHLI, M. et al. Effects of dietary n-3 fatty acids and vitamin C on semen characteristics, lipid composition of sperm and blood metabolites in fat-tailed Moghani rams. **Animal Reproduction Science**, v. 147, n. 1–2, p. 17–24, jun. 2014.

KAMAL, M. et al. Effects of tris (hydroxymethyl) aminomethane and egg yolk on the cryopreservation of buck semen. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, v. 9, n. 4, p. 676, 2022.

KASHKOOL, M. H.; AL-DELEMI, D. H. J. Testicular injection of Autologous Platelet Rich Plasma (PRP) to improve of semen parameters of goats. **Journal of Survey in Fisheries Sciences**, v. 10, n. 3s, p. 4026–4037, 2023.

KAWABATA, M. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 9, n. 1, p. 49–61, 1 mar. 1998.

KENDALL, N. R. et al. The effect of a zinc, cobalt and selenium soluble glass bolus on trace element status and semen quality of ram lambs. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 4, p. 277–283, set. 2000.

KHEIL, M. H.; BAHOUN, R.; SHARARA, F. I. Platelet-rich plasma: inconclusive evidence of reproductive outcomes in menopausal women. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 39, n. 9, p. 1987–1991, 22 set. 2022.

KNEZEVIC, N. N. et al. Is Platelet-Rich Plasma a Future Therapy in Pain Management? **Medical Clinics of North America**, v. 100, n. 1, p. 199–217, jan. 2016.

KÖHN, F.-M. et al. Influence of urogenital infections on sperm functions. **Andrologia**, v. 30, n. S1, p. 73–80, 27 abr. 2009.

KUMAR, D.; NAQVI, S. M. K. Effect of time and depth of insemination on fertility of Bharat Merino sheep inseminated trans-cervical with frozen-thawed semen. **Journal of Animal Science and Technology**, v. 56, n. 1, p. 8, 24 jul. 2014.

KYSELOVA, V. et al. Effects of p-nonylphenol and resveratrol on body and organ weight and in vivo fertility of outbred CD-1 mice. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 30, p. 1–10, 2003.

LA FALCI, V. S. N. et al. Antioxidant combinations are no more beneficial than individual components in combating ram sperm oxidative stress during storage at 5°C. **Animal Reproduction Science**, v. 129, n. 3–4, p. 180–187, dez. 2011.

LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. **Human Reproduction**, v. 10, n. suppl 1, p. 15–21, 1 out. 1995.

LANGE-CONSIGLIO, A. et al. Platelet concentrate in bovine reproduction: effects on in vitro embryo production and after intrauterine administration in repeat breeder cows. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 65, 19 dez. 2015.

LARSON, R. C.; IGNOTZ, G. G.; CURRIE, W. B. Platelet derived growth factor (PDGF) stimulates development of bovine embryos during the fourth cell cycle. **Development**, v. 115, n. 3, p. 821–826, 1 jul. 1992.

LAŠKAJ, R. et al. Superoxide dismutase, copper and zinc concentrations in platelet-rich plasma of pneumonia patients. **Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine**, v. 46, n. 2, p. 123–128, 22 mar. 2009.

LEI, X.; XU, P.; CHENG, B. Problems and Solutions for Platelet-Rich Plasma in Facial Rejuvenation: A Systematic Review. **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 43, n. 2, p. 457–469, 16 abr. 2019.

LI, C. et al. Detection of nerve growth factor (NGF) and its specific receptor (TrkA) in ejaculated bovine sperm, and the effects of NGF on sperm function. **Theriogenology**, v. 74, n. 9, p. 1615–1622, dez. 2010.

LIN, W. et al. Fibroblast Growth Factors Stimulate Hair Growth through β -Catenin and Shh Expression in C57BL/6 Mice. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–9, 2015.

MAES, D. et al. Diseases in swine transmitted by artificial insemination: An overview. **Theriogenology**, v. 70, n. 8, p. 1337–1345, nov. 2008.

MAGALON, J. et al. Characterization and Comparison of 5 Platelet-Rich Plasma Preparations in a Single-Donor Model. **Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery**, v. 30, n. 5, p. 629–638, maio 2014.

MAHMOUD, G. B.; ABDEL-RAHEEM, S. M.; HUSSEIN, H. A. Effect of combination of vitamin E and selenium injections on reproductive performance and blood parameters of Ossimi rams. **Small Ruminant Research**, v. 113, n. 1, p. 103–108, jun. 2013.

- MARINI, M. G. et al. Effects of platelet-rich plasma in a model of bovine endometrial inflammation in vitro. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 14, n. 1, p. 58, 13 dez. 2016.
- MARLOVITS, S. et al. A new simplified technique for producing platelet-rich plasma: a short technical note. **European Spine Journal**, v. 13, n. S01, p. S102–S106, 22 out. 2004.
- MARQUES, L. F. et al. Platelet-rich plasma (PRP): Methodological aspects and clinical applications. **Platelets**, v. 26, n. 2, p. 101–113, 17 fev. 2015.
- MARX, R. E. et al. Platelet-rich plasma. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 85, n. 6, p. 638–646, jun. 1998.
- MARX, R. E. Platelet-Rich Plasma (PRP): What Is PRP and What Is Not PRP? **Implant Dentistry**, v. 10, n. 4, p. 225–228, dez. 2001.
- MARX, R. E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 62, n. 4, p. 489–496, abr. 2004.
- MASOUDI, R. et al. Fertility response of artificial insemination methods in sheep with fresh and frozen-thawed semen. **Cryobiology**, v. 74, p. 77–80, fev. 2017.
- MASOUDI, R.; SHARAFI, M.; SHAHNEH, A. Z. Effects of CoQ10 on the quality of ram sperm during cryopreservation in plant and animal based extenders. **Animal Reproduction Science**, v. 208, p. 106103, set. 2019.
- MAXWELL, W. M. C.; WATSON, P. F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1–4, p. 55–65, abr. 1996.
- MCNICOL, A.; ISRAELS, S. J. Platelet Dense Granules. **Thrombosis Research**, v. 95, n. 1, p. 1–18, jul. 1999.
- MEDEIROS, C. M. O. et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 327–344, jan. 2002.
- MEHDIPOUR, M. et al. Effect of green tea (*Camellia sinensis*) extract and pre-freezing equilibration time on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. **Cryobiology**, v. 73, n. 3, p. 297–303, dez. 2016.
- MEHRAFZA, M. et al. Comparing the Impact of Autologous Platelet-rich Plasma and Granulocyte Colony Stimulating Factor on Pregnancy Outcome in Patients with Repeated Implantation Failure. **Journal of Reproduction & Infertility**, v. 20, n. 1, p. 35–41, 2019.
- MERATI, Z.; FARSHAD, A. Supplementary role of vitamin E and amino acids added to diluent on goat sperm freezability. **Cryobiology**, v. 100, p. 151–157, jun. 2021.
- MERCHÁN, W. H. et al. Platelet-rich plasma, a powerful tool in dermatology. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 13, n. 5, p. 892–901, 1 maio 2019.
- MIRON, R. J. et al. A novel method for evaluating and quantifying cell types in platelet rich fibrin and an introduction to horizontal centrifugation. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 107, n. 10, p. 2257–2271, 12 out. 2019.

- MONGA, M.; ROBERTS, J. A. Spermagglutination by Bacteria: Receptor-Specific Interactions. **Andrology**, v. 15, n. 2, p. 151–156, 1994.
- MOORE, A. I. et al. Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 26, n. 5, p. 215–218, maio 2006.
- MORRELL, J.; WALLGREN, M. Alternatives to Antibiotics in Semen Extenders: A Review. **Pathogens**, v. 3, n. 4, p. 934–946, 15 dez. 2014.
- MORTIMER, D. The functional anatomy of the human spermatozoon: relating ultrastructure and function. **MHR: Basic science of reproductive medicine**, 12 set. 2018.
- MOTLAGH, M. K. et al. Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract in soybean lecithin-based semen extender following freeze–thawing process of ram sperm. **Cryobiology**, v. 69, n. 2, p. 217–222, out. 2014.
- MOUANNES, M. et al. Use of Intra-uterine Injection of Platelet-rich Plasma (PRP) for Endometrial Receptivity and Thickness: a Literature Review of the Mechanisms of Action. **Reproductive Sciences**, v. 28, n. 6, p. 1659–1670, 22 jun. 2021.
- MOULAVI, F. et al. Platelet rich plasma efficiently substitutes the beneficial effects of serum during *in vitro* oocyte maturation and helps maintain the mitochondrial activity of maturing oocytes. **Growth Factors**, v. 38, n. 3–4, p. 152–166, 3 jul. 2020.
- NABAVINIA, M. S. et al. Improvement of human sperm properties with platelet-rich plasma as a cryoprotectant supplement. **Cell and Tissue Banking**, v. 24, n. 2, p. 307–315, 1 jun. 2023.
- NAJAFI, A. et al. Cryopreservation of Ram Semen in Extenders Containing Soybean Lecithin as Cryoprotectant and Hyaluronic Acid as Antioxidant. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 6, p. 934–940, 15 dez. 2014.
- NAJAFI, A. et al. Ethylene glycol, but not DMSO, could replace glycerol inclusion in soybean lecithin-based extenders in ram sperm cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 177, p. 35–41, fev. 2017.
- NARBONA, E. J. C. et al. Improvement of antioxidant status and semen quality by oral supplementation with vitamins c and e in rams . **Revista Científica**, v. 26, n. 3, p. 156–163, 2016.
- NAZARI, L. et al. The effects of autologous platelet-rich plasma in repeated implantation failure: a randomized controlled trial. **Human Fertility**, v. 23, n. 3, p. 209–213, 2 jul. 2020.
- NOGUEIRA, B. G. et al. Peroxidação lipídica e agentes antioxidantes no sêmen de mamíferos. **Revista Eletronica de Veterinária** , v. 15, n. 1, p. 1–15, jan. 2014.
- OKUDA, K. et al. Platelet-Rich Plasma Contains High Levels of Platelet-Derived Growth Factor and Transforming Growth Factor- β and Modulates the Proliferation of Periodontally Related Cells In Vitro. **Journal of Periodontology**, v. 74, n. 6, p. 849–857, jun. 2003.
- ORTAVANT, R. **Le cycle spermatogénétique chez le bélier**. Paris: L'Université Paris VI, 1958.
- PADILHA, R. T. et al. Effect of insulin-like growth factor-I on some quality traits and fertility of cryopreserved ovine semen. **Theriogenology**, v. 78, n. 4, p. 907–913, set. 2012.

PAGE, C. M. et al. Effects of zinc source and dietary concentration on serum zinc concentrations, growth performance, wool and reproductive characteristics in developing rams. **Animal**, v. 14, n. 3, p. 520–528, 2020.

PALACÍN, I. et al. Factors affecting fertility after cervical insemination with cooled semen in meat sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 132, n. 3–4, p. 139–144, jun. 2012.

PALACIOS, C.; ABECIA, J. A. Meteorological variables affect fertility rate after intrauterine artificial insemination in sheep in a seasonal-dependent manner: a 7-year study. **International Journal of Biometeorology**, v. 59, n. 5, p. 585–592, 25 maio 2015.

PANTOS, K. et al. A Case Series on Natural Conceptions Resulting in Ongoing Pregnancies in Menopausal and Prematurely Menopausal Women Following Platelet-Rich Plasma Treatment. **Cell Transplantation**, v. 28, n. 9–10, p. 1333–1340, 4 set. 2019.

PARRISH, J. J. et al. Capacitation of Bovine Sperm by Heparin¹. **Biology of Reproduction**, v. 38, n. 5, p. 1171–1180, 1 jun. 1988.

PASCH, L.; SCHMIDT, A.; KING, W. Clinical Observations After Prebreeding Intrauterine Plasma Infusion in 18 Mares Inseminated With Thawed Frozen Semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 99, p. 103389, abr. 2021.

PEGG, D. E. The History and Principles of Cryopreservation. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 20, n. 1, p. 005–014, 2002.

PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. **Micron**, v. 37, n. 7, p. 597–612, out. 2006.

PIETRZAK, W. S.; EPPLEY, B. L. Platelet rich plasma: Biology and new technology. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 16, n. 6, p. 1043–1054, nov. 2005.

PINHEIRO, J. C. M. N. et al. Uso do plasma rico em plaquetas na reparação tendínea em ovinos. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 15, n. 4, p. 324–331, 30 dez. 2021.

PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**. Roca ed. São Paulo: [s.n.].

RABILLARD, M. et al. Effects of autologous platelet rich plasma gel and calcium phosphate biomaterials on bone healing in an ulnar ostectomy model in dogs. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 22, n. 06, p. 460–466, 17 dez. 2009.

RAMOS-DEUS, P. et al. Application of platelet-rich plasma in the in vitro production of bovine embryos. **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, n. 6, p. 2931–2936, 23 nov. 2020.

REGHINI, M. F. S. et al. Inflammatory response in chronic degenerative endometritis mares treated with platelet-rich plasma. **Theriogenology**, v. 86, n. 2, p. 516–522, jul. 2016.

RIDLER, A. L.; WEST, D. M. Examination of teeth in sheep health management. **Small Ruminant Research**, v. 92, n. 1–3, p. 92–95, ago. 2010.

RIESCO, M. F. et al. Multiparametric Study of Antioxidant Effect on Ram Sperm Cryopreservation—From Field Trials to Research Bench. **Animals**, v. 11, n. 2, p. 283, 23 jan. 2021.

- RIGAU, T. et al. The rate of L-lactate production: a feasible parameter for the fresh diluted boar semen quality analysis. **Animal Reproduction Science**, v. 43, n. 2–3, p. 161–172, jun. 1996.
- ROSA, J. DE L. et al. Multiple flow cytometry analysis for assessing human sperm functional characteristics. **Reproductive Toxicology**, v. 117, p. 108353, abr. 2023.
- SAHA, A.; ASADUZZAMAN, M.; BARI, F. Y. Cryopreservation Techniques for Ram Sperm. **Veterinary Medicine International**, v. 2022, p. 1–16, 30 abr. 2022.
- SALAMA, M. S. et al. Effect of the addition of platelet-rich plasma to Boer buck semen on sperm quality and antioxidant activity before and after cryopreservation and in vivo fertility. **Small Ruminant Research**, v. 230, p. 107167, jan. 2024a.
- SALAMA, M. S. et al. The impact of autologous platelet-rich plasma supplement on Ossimi ram semen quality and fertility: In vivo fertility of freshly diluted and frozen-thawed spermatozoa. **Small Ruminant Research**, v. 235, p. 107283, jun. 2024b.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1–3, p. 77–111, ago. 2000.
- SCHULZE, M. et al. Antibiotics and their alternatives in Artificial Breeding in livestock. **Animal Reproduction Science**, v. 220, p. 106284, set. 2020.
- SEGABINAZZI, L. G. et al. Uterine clinical findings, fertility rate, leucocyte migration, and COX-2 protein levels in the endometrial tissue of susceptible mares treated with platelet-rich plasma before and after AI. **Theriogenology**, v. 104, p. 120–126, dez. 2017a.
- SEGABINAZZI, L. G. et al. Uterine clinical findings, fertility rate, leucocyte migration, and COX-2 protein levels in the endometrial tissue of susceptible mares treated with platelet-rich plasma before and after AI. **Theriogenology**, v. 104, p. 120–126, dez. 2017b.
- SEGABINAZZI, L. G. T. M. et al. Intrauterine Blood Plasma Platelet-Therapy Mitigates Persistent Breeding-Induced Endometritis, Reduces Uterine Infections, and Improves Embryo Recovery in Mares. **Antibiotics**, v. 10, n. 5, p. 490, 23 abr. 2021.
- SEIXAS, L. et al. Physiological and hematological parameters of sheep reared in the tropics and subtropics. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 73, n. 3, p. 622–630, maio 2021.
- SELVARAJU, S. et al. IGF1 stabilizes sperm membrane proteins to reduce cryoinjury and maintain post-thaw sperm motility in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. **Cryobiology**, v. 73, n. 1, p. 55–62, ago. 2016.
- SFAKIANOUDIS, K. et al. A Case Series on Platelet-Rich Plasma Revolutionary Management of Poor Responder Patients. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 84, n. 1, p. 99–106, 2019.
- SHARUN, K. et al. Advances and prospects of platelet-rich plasma therapy in veterinary ophthalmology. **Veterinary Research Communications**, v. 47, n. 3, p. 1031–1045, 6 set. 2023.
- SIKKA, S. Relative Impact of Oxidative Stress on Male Reproductive Function. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 7, p. 851–862, 1 jun. 2001.

- SIKKA, S. C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, n. 5, p. A146, 1996.
- SILLS, E. S. et al. First data on in vitro fertilization and blastocyst formation after intraovarian injection of calcium gluconate-activated autologous platelet rich plasma. **Gynecological Endocrinology**, v. 34, n. 9, p. 756–760, 2 set. 2018.
- SILVA, E. C. B. et al. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. **Theriogenology**, v. 77, n. 8, p. 1722–1726, maio 2012.
- SILVA, E. C. B.; GUERRA, M. M. P. Aspectos fundamentais da morfofisiologia e criopreservação espermática em pequenos ruminantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 3, p. 181–187, 2012.
- SILVA, M. N. **Hematologia Veterinária**. Belém: [s.n.].
- SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, n. 5, p. 958–978, mar. 2006.
- SOLIMAN, A. F.; SAIF-ELNASR, M.; ABDEL FATTAH, S. M. Platelet-rich plasma ameliorates gamma radiation-induced nephrotoxicity via modulating oxidative stress and apoptosis. **Life Sciences**, v. 219, p. 238–247, fev. 2019.
- SPALLANZANI, L. **Osservazioni e speienze interno ai vermicelli spermatici dell' uomo e degli animali**. Italy: [s.n.].
- STOJANOVIĆ, S.; SPRINZ, H.; BREDE, O. Efficiency and Mechanism of the Antioxidant Action of trans-Resveratrol and Its Analogues in the Radical Liposome Oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 391, n. 1, p. 79–89, jul. 2001.
- SUAREZ, S. S. Control of hyperactivation in sperm. **Human Reproduction Update**, v. 14, n. 6, p. 647–657, 29 set. 2008.
- TAMBELLA, A. M. et al. Platelet-rich Plasma and Other Hemocomponents in Veterinary Regenerative Medicine. **Wounds**, v. 30, n. 11, p. 329–336, 2018.
- TANDULWADKAR, S. et al. Autologous intrauterine platelet-rich plasma instillation for suboptimal endometrium in frozen embryo transfer cycles: A pilot study. **Journal of Human Reproductive Sciences**, v. 10, n. 3, p. 208, 2017.
- TAPIA, J. et al. The Membrane of the Mammalian Spermatozoa: Much More Than an Inert Envelope. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. s3, p. 65–75, 11 jun. 2012.
- TAYYAB KHAN, M. et al. Synergistic effect of extracellular adenosine triphosphate and quercetin on post-thaw quality and fertilization potential of Lohi ram sperm. **Cryobiology**, p. 104593, out. 2023.
- TREMELLEN, K. Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. **Human Reproduction Update**, v. 14, n. 3, p. 243–258, 1 maio 2008.
- UNDERWOOD, E.; SOMERS, M. Studies of zinc nutrition in sheep. I. The relation of zinc to growth, testicular development, and spermatogenesis in young rams. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 20, n. 5, p. 889, 1969.

- USTUNER, B. et al. Effect of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) seminal plasma on the post-thaw quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based or egg yolk-based extender. **Animal Reproduction Science**, v. 164, p. 97–104, 1 jan. 2016.
- VANNELLI, B. G. et al. Insulin-like growth factor-1 (IGF-I) and IGF-I receptor in human testis: an immunohistochemical study. **Fertility and Sterility**, v. 49, n. 4, p. 666–669, abr. 1988.
- WANG, Y. et al. Coenzyme Q10 improves the quality of sheep sperm stored at room temperature by mitigating oxidative stress. **Animal Science Journal**, v. 93, n. 1, 14 jan. 2022.
- WATHES, D. C.; ABAYASEKARA, D. R. E.; AITKEN, R. J. Polyunsaturated Fatty Acids in Male and Female Reproduction1. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 2, p. 190–201, 1 ago. 2007.
- WATSON, P. F.; DUNCAN, A. E. Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. **Cryobiology**, v. 25, n. 2, p. 131–142, abr. 1988.
- WOODWARD, E. M.; TROEDSSON, M. H. T. Inflammatory mechanisms of endometritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 47, n. 4, p. 384–389, 3 jul. 2015.
- YAN, B. et al. Effect of autologous platelet-rich plasma on human sperm quality during cryopreservation. **Cryobiology**, v. 98, p. 12–16, 1 fev. 2021.
- YILDIZ, C. et al. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology**, v. 54, n. 4, p. 579–585, set. 2000.
- YUE, D. et al. Effect of Vitamin E supplementation on semen quality and the testicular cell membranal and mitochondrial antioxidant abilities in Aohan fine-wool sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 118, n. 2–4, p. 217–222, abr. 2010a.
- YUE, D. et al. Effect of Vitamin E supplementation on semen quality and the testicular cell membranal and mitochondrial antioxidant abilities in Aohan fine-wool sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 118, n. 2–4, p. 217–222, abr. 2010b.
- ZADEHMODARRES, S. et al. Treatment of thin endometrium with autologous platelet-rich plasma: a pilot study. **JBRA Assisted Reproduction**, v. 21, n. 1, 2017.
- ZHANG, S. S. et al. The cryoprotective effects of soybean lecithin on boar spermatozoa quality. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 22, p. 6476–6480, 16 nov. 2009.
- ZHU, Y. et al. Basic science and clinical application of platelet-rich plasma for cartilage defects and osteoarthritis: a review. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 21, n. 11, p. 1627–1637, 1 nov. 2013.
- .

CAPÍTULO 2

Este artigo será submetido a Revista Small Ruminant Research.

**Effects of Platelet-Rich and Poor Autologous Plasma on the Cryopreservation of
Sheep Semen**

Luan Sitó-Silva¹, Beatriz L. De Camillo¹; Luiz Gustavo F. Lima¹, Paula Zanin Rattes¹,
João Carlos Pinheiro Ferreira¹, Camila de Paula Freitas-Dell'Aqua¹, Paulo F. Marcusso²,
Eunice Oba¹.

¹ Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, School of Veterinary
Medicine and Animal Science, São Paulo State University .

²Department of Veterinary Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine and Animal
Science, FMVZ, Unesp, Botucatu, São Paulo

Corresponding author: Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction,
School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University
(UNESP), Botucatu-SP, 18618-681, Brazil; E-mail address: eunice.oba@unesp.br

ABSTRACT

The objective of this study is to assess the effect of autologous platelet-rich plasma (PRP) and platelet-poor plasma (PPP) on the cryopreservation of ovine semen. Eight sheep were used, previously trained for collection using an artificial vagina. The collected semen was separated into five parts and diluted in Botubov® (Botupharma, Botucatu, Brazil), and five treatments were tested: Control (pure commercial semen extender); PRP10 (Extender supplemented with 10 million platelets/mL); PRP20 (Extender supplemented with 20 million platelets/mL); PRP40 (Extender supplemented with 40 million platelets/mL); and PPP (Extender supplemented with PPP in the same volume used for PRP40). The semen was then packaged in French straws, cooled for 3 hours at 5°C, and frozen in liquid nitrogen until evaluation. Kinetic parameters were evaluated using computer-assisted sperm analysis (CASA), immediately post-thaw and after a 3-hour thermoresistance test at 37°C, as well as assessment of plasma membrane and acrosomal integrity (MPAI), mitochondrial potential (MP), superoxide anion (O_2^-) production, and hydrogen peroxide (H_2O_2) production by flow cytometry. Both PRP and PPP were shown to be safe for the cryopreservation of sheep semen, with improvements observed in half of the animals in terms of flow cytometry parameters. When grouped together, it was evident that the PPP group displayed greater integrity of the plasma membrane and acrosome ($P=0.02$), more stable cells ($P=0.03$), and increased production of H_2O_2 ($P=0.05$). In conclusion, PRP and PPP are safe and can be viable alternatives. PPP showed better results for plasmatic and acrosomal membrane integrity, as well as the number of stable cells in half of the animals. This highlights PPP as a promising antioxidant and cryoprotectant for sheep semen.

Keywords: PRP; PPP, ram, semen extender

1. INTRODUCTION

Fertility with frozen semen in sheep remains low (Kumar and Naqvi 2014) and is influenced by various factors, primarily due to the low post-thaw motility of the semen used (Palacios and Abecia 2015). The only place where fertility is high with frozen ovine semen is in Norway, and what happens in this region is still being studied (Maxwell and Watson 1996; Palacín et al. 2012). In order to improve the quality of post-thawed ovine semen and, consequently, enhance semen quality, many experiments have been conducted aiming to add components, mostly antioxidants (Yue et al. 2010; Riesco et al. 2021), and thus attempt to increase fertility rates in the field.

Platelet-rich plasma (PRP) is described as an increase in the platelet count above the normal levels found in blood (Zhu et al. 2013). It can be considered so when it possesses three to seven times the normal concentration of the species, which, in sheep, averages approximately 400,000/ μ L (Knezevic et al. 2016; Bos-Mikich, Oliveira, and Frantz 2018; Merchán et al. 2019; Pinheiro et al. 2021). Platelets are the smallest blood cells, anucleated cell fragments also called megakaryocytes (Pietrzak and Eppley 2005), which can release stored cytokines in cytoplasmic granules as well as growth factors (Bos-Mikich, Oliveira, and Frantz 2018). Among the growth factors are transforming growth factor β (TGF- β), fibroblast growth factor (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), insulin-like growth factor 1 (IGF-1), platelet-derived growth factor (PDGF), and the release of minerals such as zinc (Zn), calcium (Ca), enzymes (superoxide dismutase-SOD), mediators (histamine and serotonin), and proteins (McNicol and Israels 1999; Appel et al. 2002; Marx 2004; Laškaj et al. 2009; Castillo et al. 2011; Magalon et al. 2014; Irmak, Demirtaş, and Gümüşderelioğlu 2020; Bader et al. 2020).

The initial research on using PRP in reproduction focused on females, both in humans to increase endometrial thickness (Chang et al. 2015), and in equines for the

treatment of endometritis (Woodward and Troedsson 2015; Reghini et al. 2016). In semen biotechnologies, it has been used in research aiming to improve post-thaw semen quality, being utilized in human semen (Yan et al. 2021; Nabavinia et al. 2023), goats (Alcay et al. 2021), buffaloes (El-Sherbiny et al. 2022) and rabbits (Abdulla, Rebai, and Al-Delemi 2022). Autologous PRP would be a way to complement the semen extender and minimize the adverse effects of cryopreservation.

The use of growth factors, including insulin-like growth factor (IGF), nerve growth factor (NGF), epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor (FGF), and serotonin, to combat the deterioration of sperm function caused by cryopreservation, has shown promising results regarding sperm motility and the integrity of the plasma membrane, mitochondria, and acrosome. Platelet-rich plasma (PRP) is a homogeneous, compatible, and non-antigenic mixture containing all the growth ingredients mentioned above, in addition to proteins and cytokines (El-Sherbiny et al. 2022).

So far, it has been observed that PRP improves sperm kinetic parameters as well as the integrity of the plasma and acrosomal membrane in buffaloes, goats, and humans (Alcay et al. 2021; Yan et al. 2021; El-Sherbiny et al. 2022). The objective of this study is to assess the effect of various concentrations of autologous PRP and platelet-poor plasma on the cryopreservation of ovine semen. The hypothesis for this work is that the potential benefit of using PRP and PPP is that it may aid in the sperm cryopreservation process, improving kinetic parameters, acting as an antioxidant, and helping maintain the integrity of the sperm membrane.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 EXPERIMENTATION LOCATION

The project was conducted following the ethical principles recommended by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA), Unesp, under number 0385/2023.

The study was carried out at the "Laboratory of Applied Biotechnology Studies in Reproduction of Sheep and Goats" of the Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, FMVZ - UNESP, in the city of Botucatu-Sao Paulo, located at latitude 22°53'09" south and longitude 48°26'42" west, at an altitude of 804 meters, during late summer and early autumn.

2.2 ANIMAL SELECTION

The selected animals were in the reproductive season (late summer and autumn), clinically healthy as assessed by physical examination (e.g., abscesses, legs, hooves, teeth, vision, etc.), at least one year old, confirmed by examining the dental arcade, and had the first incisor molt (Ridler and West 2010) at the beginning of the experiment. The testicles and epididymides were palpated to identify asymmetries, nodules, granulomas, and abnormal consistencies.

Eight male sheep were used, with an average age of 18 months, and two ejaculates per ram were used for semen freezing. These animals underwent a one-week adaptation period during which serial semen collections were carried out every two days for cell renewal.

The animals were kept in individual stalls with a diet based on corn silage, concentrate for the maintenance of ovine breeders with 16% crude protein (CP), and 85% total digestible nutrients (TDN), with ad libitum access to water and mineral salt.

2.3 SEMEN COLLECTION AND ANALYSIS

After conditioning the animals for collection with an artificial vagina (previously heated to 42°C) using a sheep as a model, semen was obtained, and macroscopic analyses were performed, assessing: color, odor, appearance, and volume.

For computer-assisted semen analysis (CASA), an aliquot of semen with a concentration between 20 and 50x10⁶/mL was subjected to computer-assisted evaluation of sperm quality (CASA, Hamilton Thorn Research - IVOS® 12, Beverly, Massachusetts, USA), previously adjusted for ovine semen evaluation.

In each sample, three randomly chosen fields were evaluated, with a minimum of 200 spermatozoa per field, totaling 1000 cells. The following parameters were assessed: total sperm motility (TM, %), progressive sperm motility (PM, %), average velocity of the trajectory (VAP, µm/s), curvilinear velocity (VCL, µm/s), linear progressive velocity (VSL, µm/s), lateral head displacement amplitude (ALH, µm), tail beat frequency (BCF, Hz), straightness (STR, %), linearity (LIN, %), and the percentage of sperm with rapid (RAP, %), medium (MED, %), and slow (SLOW, %) movement, with settings adjusted for sheep.

Ten microliters (µL) were diluted in four milliliters (mL) of distilled water at a dilution rate of 1:400 for sperm concentration assessment using a Neubauer chamber under an optical microscope with a 200x magnification. A second aliquot was used for morphological evaluation of spermatozoa using a differential interference contrast microscope (DIC), counting 200 cells (CBRA 2013).

2.4 HEMATOLOGICAL EVALUATION

For pre-study laboratory tests, a single 5 mL blood sample was drawn from the external jugular vein using a K3 EDTA 7.5% vacutainer anticoagulant tube for blood counts and another 5 mL sample in a dry tube for biochemical analysis.

2.4.1 Hemogram

To perform the hemogram, red blood cell, white blood cell, and platelet counts, as well as hemoglobin determination, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), mean platelet volume (MPV), and red cell distribution width (RDW), were performed using a veterinary automated cell counter (impedance). The packed cell volume (PCV) was determined by the Strumia microcapillary method (11,400 rpm for 5 minutes). The leukocyte differential count, along with morphological evaluation of red blood cells, white blood cells (Instant-Prov, Newprov, Pinhais, Paraná, Brazil).

Platelet counting in a Neubauer chamber was performed as previously described (BRECHER and CRONKITE 1950). For this, 2 mL of 1% ammonium oxalate solution was homogenized with 20 μ L of blood for five minutes on a vortex. Next, both sides of the chamber were filled, followed by incubation in a humid chamber for 20 minutes. The platelets contained in the 5 diagonal quadrants of the central reticle of the chamber on both sides were counted, and the platelet concentration/ μ L was obtained after multiplication by a factor of 2,525.

2.4.2 Biochemical Analyses

The tube intended for obtaining serum was centrifuged (3,500 rpm for 5 minutes) after collection and taken to the laboratory for analysis. Serum biochemical evaluation

was performed on an automated biochemical device (Roche® - Cobas Mira Plus) using kits (Bioclin® and Labtest®) according to the manufacturer's recommendations. Biochemical analyses included aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), gamma-glutamyltransferase (GGT), urea, and creatinine.

2.5 OBTAINING AUTOLOGOUS PLATELET-RICH PLASMA (PRP)

To obtain PRP, the double centrifugation technique was used. Briefly, 10 mL of blood was collected from each animal through the external jugular vein into sterile vacuum tubes with EDTA. The blood was transferred to a sterile 15 mL Falcon tube and centrifuged at 700g/5min (Centrifuge 80-2B Centrobio®). The supernatant plasma was removed with a Pasteur pipette and transferred to a new 15 mL Falcon tube. The second centrifugation was performed at 700g/12min. Three-quarters of the supernatant were discarded, and the remainder was considered PRP. Five minutes before adding to the semen extender, PRP was activated with 10% Calcium Chloride.

2.6 SEMEN FREEZING

2.6.1 Semen Dilution

The semen was diluted in Botubov® (Botupharma, Botucatu, Brazil). Five treatments were tested: Control (pure commercial semen extender); 10 (extender supplemented with 10 million platelets/mL); 20 (extender supplemented with 20 million platelets/mL); 40 (extender supplemented with 40 million platelets/mL); and PLA (extender supplemented with platelet-poor plasma, PPP; in the same volume used for PRP40).

After kinetic evaluations, the semen was diluted and frozen in French straws of 0.25 mL. The ejaculate was diluted at a concentration of 200×10^6 /mL, and 4

straws/group/animal/ejaculate were frozen. Cooling was performed in a refrigerator (Minitub 518C), where the straws were placed horizontally on the rack and remained for 3 hours. Subsequently, the rack was transferred to a 44-liter capacity box containing liquid nitrogen. Then, the straws were positioned at three centimeters from the liquid, only in nitrogen vapor, in the horizontal position, for 20 minutes. Then, they were submerged in nitrogen, placed in racks, and stored in cryogenic cylinders for later analysis.

2.7 POST-THAW EVALUATION

The samples were thawed at 37°C for 30 seconds and analyzed at two different time points (0 and 3h). The samples were kept in microtubes and incubated in a dry water bath at 37°C (thermal resistance test - TTR) until the final evaluation (CBRA 2013).

2.8 SPERM EVALUATION BY FLOW CYTOMETRY

For sperm evaluation by flow cytometry, the BD LSR Fortessa equipment (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipped with excitation lasers: blue 488-nm, 100 mW and emission filters 530/30nm (FITC, YOPRO, and CM-H2DCFDA) and 695/40nm (Propidium Iodide and MitoSOX Red); red 640-nm, 40 mW with a 660/20 nm filter (MitoStatus Red); and violet 405-nm, 100 mW, with a 450/50 nm filter (Hoechst) was used. At least 10,000 cells per sample were analyzed, and the data were evaluated using BD FACSDiva™ software v 6.1.

The samples were diluted in TALP-PVA, according to Parrish et al.(1988) modification: 100 mM NaCl, 3.1 mM KCl, 25.0 mM NaHCO₃, 0.3 mM NaH₂PO₄, 21.6 mM DL-sodium lactate 60%, 2.0 mM CaCl₂, 0.4 mM MgCl₂, 10.0 mM Hepes-free acid, 1.0 mM sodium pyruvate, 1.0 mg/mL polyvinyl alcohol-PVA, and 25 µg/mL gentamicin)

at a concentration of 5×10^6 sperm/mL, supplemented with Hoescht 33342 ($7\mu\text{M}$; 145333, Sigma) for debris elimination.

2.8.1 Plasma Membrane and Acrosome Integrity

To assess plasma membrane and acrosome integrity, a combination of propidium iodide (PI; P4170, Sigma) and FITC-PSA (Pisum sativum agglutinin conjugated to fluorescein isothiocyanate; L0770, Sigma) was used, according to (Freitas-Dell'Aqua et al. 2012). Thus, in a $200\ \mu\text{L}$ sample of diluted semen, $1.5\ \mu\text{M}$ IP and $2\ \text{ng}$ of FITC-PSA were added, and the samples were incubated for 15 min at 37°C , protected from light.

2.8.2 Plasma Membrane Destabilization, Mitochondrial Membrane Potential, and Superoxide Production

For the evaluation of plasma membrane destabilization, mitochondrial membrane potential, and superoxide ($\text{O}_2^{\bullet-}$) production in the mitochondrial matrix, a combination of YOPRO (YP; labeling for cells with destabilized plasma membrane; Y3603, Life Technologies), MitoStatus Red (MST; mitochondrial potential; 564697, BD Pharmingen), and MitoSOXTM Red (MSR; superoxide anion generation in the mitochondrial matrix, M36008, Life Technologies) was used, according to (Freitas-Dell'Aqua et al. 2018). Thus, in a $500\ \mu\text{L}$ sample of diluted semen, $25\ \text{nM}$ YP, $20\ \mu\text{M}$ MST, and $2\ \mu\text{M}$ MSR were added, followed by incubation at 37°C for 20 minutes.

2.8.3 Intracellular Hydrogen Peroxide Production

To assess intracellular hydrogen peroxide (H_2O_2) production, CM-H2DCFDA (C6827, Life Technologies) in combination with propidium iodide was used. Each aliquot of $500\ \mu\text{L}$ of semen extended in TALP-PVA had $1.5\ \mu\text{M}$ propidium iodide (diluted in

TALP-PVA) and 10 μ M CM-H2DCFDA (diluted in dimethyl sulfoxide) added before being incubated at 37°C for 45 minutes.

2.9 STATISTICAL ANALYSIS

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9.3.0 software and expressed as mean and standard error. Variables related to kinetics, morphology, cytometry, and platelet quantity were evaluated for normality using the Shapiro-Wilk test and QQ-plot. Variables that showed a normal distribution were represented by the mean and standard deviation, and the comparison of means was performed by two-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post hoc test. For platelet quantity in total blood and PRP, the T-test was used to demonstrate if there was a difference in the quantity of platelets.

3. RESULTS

The hemogram and biochemical results of the animals in the study, prior to the start of the experiment, were within the species reference values (PUGH 2004). The total and progressive motility of fresh spermatozoa was 93.3 ± 1.1 ; $58.5 \pm 2.0\%$, respectively. The platelet count in the total blood of the animals was $492,080 \pm 44,158/\mu\text{L}$, PRP was $1,706,095 \pm 188,983$, and PPP was $25,206 \pm 8,936$ ($P < 0.001$). The final average volume of PRP was 499.9 ± 26.9 , and the final volume of PRP added to 1 mL of freezing extender for groups 10, 20, 40, and PLA was 6.7 ± 0.8 ; 13.5 ± 1.6 ; 26.9 ± 3.3 ; and 26.9 ± 3.3 , respectively. The semen freezing process significantly reduced sperm motility ($P < 0.0001$). Among the groups evaluated post-thawing, there was no difference in any of the sperm kinetic parameters assessed by CASA (Table 1; Fig.1).

Among the groups evaluated post-thawing and incubated in a water bath at 37°C for 3 hours (TTR), there was no difference in any of the sperm kinetic parameters assessed by CASA (Table 2).

Within the flow cytometry evaluation for plasma and acrosomal membrane integrity, no differences were found between the treatments for any of the assessments. However, during data analysis, an improvement pattern was observed in four out of eight animals in the study, data that were not observed in kinetics (CASA, Table 3). When only this data was grouped, there was a significant improvement in the percentage of cells with plasma and acrosomal membrane integrity, as well as in the quantity of stable cells among the groups (Table 4; Fig. 2), where both showed an improvement in the PLA group (plasma only) when compared to the control group. It is important to note that numerically, the other groups showed improvement in all assessments.

For the evaluation of plasma membrane destabilization, mitochondrial membrane potential, superoxide ($\text{O}_2^{\bullet-}$) production, and intracellular hydrogen peroxide

274 (H₂O₂) production, no differences were found between the treatments. Four animals
275 showed improvement in the evaluations (Table 4; Fig. 2), and when grouped, a higher O₂
276 production and a higher quantity of H₂O₂ production in dead cells were observed in the
277 20 group.

4. DISCUSSION

This study aimed to investigate the use of different concentrations of autologous platelet-rich plasma (PRP) to assist in the cryopreservation process of ovine semen. However, it did not appear to significantly improve the parameters assessed by CASA after thawing and a three-hour thermoresistance test. Nevertheless, our observations suggest that an improvement in sperm cell quality may be observed when frozen with PRP or plasma alone. To the best of our knowledge, this is one of the first evaluating the addition of PRP to the seminal cryopreservation extender with an in-depth assessment of its post-thaw effects, not supporting our hypotheses.

PRP has been a focus of studies involving human (Yan et al. 2021), boar(Alcay et al. 2021), and buffalo (El-Sherbiny et al. 2022) semen, aiming to utilize the growth factors, cytokines, proteins, and other components released by platelets to act directly on the sperm, thus potentially improving post-thaw indices. Research into improving post-thaw quality remains a focal point not only in humans but also in all domestic species, as mentioned before. Platelets are responsible for releasing various components that have demonstrated positive effects on post-thaw motility and viability (Ustuner et al. 2016).

Sperm motility is directly linked to the sperm's ability to reach the fallopian tube and fertilize the newly ovulated oocyte (David et al. 2015). However, the motility was affected by the cryopreservation process, as in other studies, where the freezing-thawing process causes a decrease in membrane integrity, a reduction in ATP production, and consequently a decrease in sperm motility (Motlagh et al. 2014; Alcay et al. 2015; 2021).

The PRP concentrations used in our study did not influence the sperm kinetic data. However, it has been mentioned that PRP improves sperm quality (Alcay et al. 2021; Yan et al. 2021; El-Sherbiny et al. 2022; Abdulla, Rebai, and Al-Delemi 2022; Nabavinia et al. 2023). The lack of influence in our study may have occurred mainly due to the egg

yolk-based semen extender we used, which is a tested and proven commercial extender in terms of ovine (Canuto et al. 2022) and bovine (Bertol et al. 2014; Celeghini et al. 2010) semen post-thaw quality. Unfortunately, it's not possible to know the specific components, like antioxidants and their concentrations in Botubov®, but the extender was tested and works for most animals. This could have impacted and concealed the beneficial effects observed in other studies with basic Tris-egg yolk diluent (El-Sherbiny et al. 2022) or Tris-soy lecithin (Alcay et al. 2021) without additional components that the extender we used likely contains. Furthermore, there are studies where it has been demonstrated that there is a synergistic effect when antioxidants are combined (La Falci et al. 2011; Merati and Farshad 2021).

A difference was found in the flow cytometry analysis in a group of animals in our study ($n=4$). Ram semen has a large amount of polyunsaturated fatty acids that provide fluidity to the plasma membrane, which will participate in the fusion between the sperm and the oocyte (Wathes, Abayasekara, and Aitken 2007; Rosa et al. 2023). In this study, plasma membrane and acrosome integrity were higher for the experimental group with only plasma added and numerically higher for the treated groups compared to the control group, as observed in buffaloes (El-Sherbiny et al. 2022), humans (Yan et al. 2021) and goats (Alcay et al. 2021). This may be attributed to IGF-1, which has demonstrated efficiency in protecting sperm plasma membrane (Padilha et al. 2012). Membrane integrity is crucial for capacitation and sperm metabolism and IGF-1 has shown to have receptors not only in the male reproductive tract but also in spermatocytes and spermatids (Vannelli et al. 1988; Beer-Ljubić et al. 2009; Padilha et al. 2012). Regarding acrosomal integrity, which was higher in our study in the treated group, it is important for maintaining the fertilization potential of the sperm (Celeghini et al. 2010;

Rosa et al. 2023), covering a large part of the sperm head (Abou-Haila and Tulsiani 2000), and is responsible for digesting the zona pellucida (Hossain et al. 2011).

Our study supports other studies where membrane stability can be affected by the addition of PRP, and it is a key factor in maintaining fertilization potential, as the recognition and fusion between the oocyte and the sperm occur due to molecules present in the plasma membrane. The data from adding PRP to human sperm (Yan et al. 2021) also support this finding.

The amount of superoxide anion produced within the cell showed that oxidative stress can lead to problems for the sperm. The plasma appeared to reduce its production, and although there was no significant difference, numerically, the production in the PRP-treated groups was also lower. Oxidative stress is commonly reported as one of the damages that occur during sperm cryopreservation (Yan et al. 2021). PRP has an antioxidant role, already demonstrated in mammalian cells (Soliman, Saif-Elnasr, and Abdel Fattah 2019). In theory, this role would improve all sperm parameters (Yan et al. 2021), which did not occur in our study, likely due to the diluent used, as discussed earlier.

The group supplemented with 20 million platelets/mL produced a higher amount of hydrogen peroxide (H_2O_2) in the group of animals ($n=4$) where a difference was found in the assessments. An increase in this parameter could reduce sperm motility by diffusing through the plasma membrane and causing inactivation of enzymes, limiting the sperm's antioxidant defense mechanism (Agarwal et al. 2014). However, this free radical is produced even by intact and viable cells, emphasizing that PRP acts as an antioxidant since the other parameters evaluated in the study were not altered.

Something worth noting is that the biggest difference was found between the control group and the group with only plasma added, or the platelet-poor plasma (PPP). The latter was not activated with calcium chloride for the release of cytokines and growth

factors to occur more rapidly, as necessary (Cavallo et al. 2016). Even with the release, the small number of platelets in this plasma would not produce the same amount as PRP. This clearly indicates that perhaps plasma contains components that can aid in the cryopreservation process and improve sperm quality. Another fact is that serum would cause direct agglutination of sperm, a fact that did not occur in our experiment, as in the experiment with human sperm, which can be attributed to platelet activation before its use (Yan et al. 2021).

The amount of superoxide anion produced in the control group cells was much higher than in those of the treated groups. While there was no significant difference, there are numerical indications of a possible reduction in the production of this free radical when PRP is added. Its reduction may have occurred due to the antioxidant effect of PRP or just the PPP, since it is produced and acts locally, participating in the production of hydrogen peroxide (Sikka 2001; Nogueira et al. 2014).

There are few studies testing the fertility of sperm treated with PRP. Only the study with buffaloes (El-Sherbiny et al. 2022) tested the cleavage rate of in vitro embryos and was able to observe an improvement in blastocyst production in the group treated with 5% PRP. The main application of PRP in animal reproduction is still in equine reproduction, mainly for the treatment of endometritis in mares (Reghini et al. 2016), and it has already been observed that PRP in the uterus improves uterine quality, acting as an antibiotic and anti-inflammatory (Reghini et al. 2016; Segabinazzi et al. 2017; Mouanness et al. 2021). Therefore, it is important for studies to focus on fertility rates even if semen with unsatisfactory motility is used. The intrinsic effects of PRP on semen have not yet been tested on a large scale, nor have their maximum concentrations to aid in cryopreservation. Perhaps PRP can work in conjunction with semen and improve uterine quality even when added to the semen extender. This improvement in pre-insemination

uterine quality has already been demonstrated in women (Chang et al. 2015) with improved endometrium, higher embryo implantation rate, and pregnancy rate, but research in veterinary medicine is still necessary.

It may be that PRP or only plasma is beneficial, especially for animals considered challenging for cryopreservation. There are still no studies in sheep species, but considering the equine species, where animals can be considered "bad-coolers" or "good-coolers" (Hartwig et al. 2014; Campos et al. 2020) , according to the post-thaw parameters of the animal, this extender supplementation can improve post-thaw quality and perhaps the fertility of these animals.

One significant advantage of platelet-poor plasma is its ease of production in the field. It only requires a single centrifugation, and the acquisition of a centrifuge is cost-effective. Something important to discuss is the biological safety of using PRP in the semen extender, since being an animal-derived product, it can carry diseases that, if not properly addressed, can contaminate entire herds and the losses could be incalculable. Therefore, ways to improve and test the origin of the donor animal, or even test the health of the material before use, would be important.

5. CONCLUSION

In conclusion, platelet-rich and platelet-poor plasma can be a viable, safe, and cost-effective option for the cryopreservation of sheep semen.

Acknowledgments

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001. FAPESP Process 2020/15556-8, São Paulo Research Foundation (FAPESP)

CREDIT AUTHORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

Luan Sitó-Silva: Data curation, Methodology, Formal analysis, Writing. **Beatriz L. De Camillo:** Methodology. **Luiz Gustavo F. Lima:** Methodology. **Paula Zanin Rattes:** Methodology. **João Carlos Pinheiro Ferreira:** Methodology, Resources. **Camila de Paula Freitas-Dell'Aqua:** Methodology, Formal analysis. **Paulo F. Marcusso:** Methodology, Resources. **Eunice Oba:** Conceptualization, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest here.

6. REFERENCES

- Abdulla, A. K., Rebai, T., Al-Delemi, D. H. J., 2022. Protective Effects of Autologous Platelet-Rich Plasma (PRP) on the Outcome of Cryopreservation in Rabbit Sperm. *Cellular and Molecular Biology*, 68(4), 113–121.
<https://doi.org/10.14715/cmb/2022.68.4.14>
- Abou-Haila, A., Tulsiani, D. R. P., 2000. Mammalian Sperm Acrosome: Formation, Contents, and Function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 379(2), 173–182.
<https://doi.org/10.1006/abbi.2000.1880>
- Agarwal, A., Virk, G., Ong, C., du Plessis, S. S., 2014. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. *The World Journal of Men's Health*, 32(1), 1.
<https://doi.org/10.5534/wjmh.2014.32.1.1>
- Alcay, S., Aktar, A., Koca, D., Kilic, M. A., Akkasoglu, M., Sagirkaya, H., 2021. Positive effect of autologous platelet rich plasma on Saanen buck semen cryopreservation in non-breeding season. *Cryobiology*, 103, 45–48.
<https://doi.org/10.1016/J.CRYOBIOL.2021.09.012>
- Alcay, S., Berk Toker, M., Gokce, E., Ustuner, B., Tekin Onder, N., Sagirkaya, H., Nur, Z., Kemal Soylu, M., 2015. Successful ram semen cryopreservation with lyophilized egg yolk-based extender. *Cryobiology*, 71(2), 329–333.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.08.008>
- Appel, T. R., Pötzsch, B., Müller, J., Von Lindern, J.-J., Bergé, S. J., Reich, R. H., 2002. Comparison of three different preparations of platelet concentrates for growth factor enrichment. *Clinical Oral Implants Research*, 13(5), 522–528.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.2002.130512.x>

- 435 Bader, R., Ibrahim, J. N., Moussa, M., Mourad, A., Azoury, J., Azoury, J., Alaaeddine, N.,
 436 2020. *In vitro* effect of autologous platelet-rich plasma on H₂O₂-induced oxidative
 437 stress in human spermatozoa. *Andrology*, 8(1), 191–200.
 438 <https://doi.org/10.1111/andr.12648>
- 439 Beer-Ljubić, B., Aladrović, J., Marenjak, T. S., Laškaj, R., Majić-Balić, I., Milinković-
 440 Tur, S., 2009. Cholesterol concentration in seminal plasma as a predictive tool for quality
 441 semen evaluation. *Theriogenology*, 72(8), 1132–1140.
 442 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.07.009>
- 443 Bertol, M. A. F., Weiss, R. R., Fujita, A. S., Kozicki, L. E., de Abreu, A. C. M. R., Pereira,
 444 J. F. S., 2014. Dois diluentes comerciais na criopreservação de espermatozoides do
 445 epidídimo de touros. *Ciência Rural*, 44(9), 1658–1663. [https://doi.org/10.1590/0103-](https://doi.org/10.1590/0103-8478CR20130747)
 446 [8478CR20130747](https://doi.org/10.1590/0103-8478CR20130747)
- 447 Bos-Mikich, A., Oliveira, R., Frantz, N., 2018. Platelet-rich plasma therapy and
 448 reproductive medicine. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(5), 753–756.
 449 <https://doi.org/10.1007/S10815-018-1159-8/METRICS>
- 450 BRECHER, G., CRONKITE, E. P., 1950. Morphology and Enumeration of Human Blood
 451 Platelets. *Journal of Applied Physiology*, 3(6), 365–377.
 452 <https://doi.org/10.1152/JAPPL.1950.3.6.365>
- 453 Campos, G. A., Garcia, V. F. C., Freitas-Dell'Aqua, C. P., Segabinazzi, L. G. T. M.,
 454 Maciel, L. F. S., Alvarenga, M. A., Papa, F. O., Dell'Aqua, J. A., 2020. Sodium Caseinate
 455 and Cholesterol Improve Bad Cooler Stallion Fertility. *Journal of Equine Veterinary*
 456 *Science*, 93, 103201. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103201>

- 457 Canuto, L. E. F., Segabinazzi, L. G. T. M., De Araújo, E. A. B., Silva, L. F. M. C., De
 458 Oliveira, S. N., Dalanezi, F. M., Dell'Aqua, J. A., Papa, F. O., Oba, E., 2022. Effect of
 459 quercetin or butylated hydroxytoluene on cooled or frozen-thawed ram sperm quality.
 460 *Semina: Ciências Agrárias*, 43(2), 841–854. [https://doi.org/10.5433/1679-](https://doi.org/10.5433/1679-0359.2022v43n2p841)
 461 0359.2022v43n2p841
- 462 Castillo, T. N., Pouliot, M. A., Kim, H. J., Dragoo, J. L., 2011. Comparison of Growth
 463 Factor and Platelet Concentration From Commercial Platelet-Rich Plasma Separation
 464 Systems. *The American Journal of Sports Medicine*, 39(2), 266–271.
 465 <https://doi.org/10.1177/0363546510387517>
- 466 Cavallo, C., Roffi, A., Grigolo, B., Mariani, E., Pratelli, L., Merli, G., Kon, E., Marcacci,
 467 M., Filardo, G., 2016. Platelet-Rich Plasma: The Choice of Activation Method Affects
 468 the Release of Bioactive Molecules. *BioMed Research International*, 2016, 1–7.
 469 <https://doi.org/10.1155/2016/6591717>
- 470 CBRA, C. B. R. A., 2013. *Manual Para Exame Andrológico e Avaliação De Sêmen*
 471 *Animal* (3ed ed.).
- 472 Celeghini, E. C. C., Nascimento, J., Raphael, C. F., Andrade, A. F. C., Arruda, R. P. 2010.
 473 Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram
 474 sperm by fluorescent probes. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*,
 475 62(3), 536–543. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352010000300006>
- 476 Chang, Y., Li, J., Chen, Y., Wei, L., Yang, X., Shi, Y., Liang, X., 2015. Autologous platelet-
 477 rich plasma promotes endometrial growth and improves pregnancy outcome during in
 478 vitro fertilization. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(1),
 479 1286. [/pmc/articles/PMC4358582/](https://doi.org/10.1155/2015/1286)

- 480 David, I., Kohnke, P., Lagriffoul, G., Praud, O., Plouarboué, F., Degond, P., Druart, X.,
 481 2015. Mass sperm motility is associated with fertility in sheep. *Animal Reproduction*
 482 *Science*, 161, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.08.006>
- 483 El-Sherbiny, H. R., Abdelnaby, E. A., Samir, H., Fathi, M., 2022. Addition of autologous
 484 platelet rich plasma to semen extender enhances cryotolerance and fertilizing capacity of
 485 buffalo bull spermatozoa. *Theriogenology*, 194, 104–109.
 486 <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2022.09.029>
- 487 Freitas-Dell'Aqua, C. P., Guasti, C. P., Papa, F. O., Canisso, I. F., Della'Aqua Junior, J.
 488 A., 2018. Superoxide anion is reduced in gradient selected cryopreserved stallion semen
 489 despite high mitochondrial potential. *Journal of Equine Veterinary Science*, 66, 57.
- 490 Freitas-Dell'Aqua, C. P., Guasti, P. N., Monteiro, G. A., Maziero, R. R. D., Della'Aqua
 491 Jr, J. A., Papa, F. O., 2012. Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen
 492 stallion spermatozoa. . *Animal Reproduction*, 9, 941.
- 493 Hartwig, F. P., Lisboa, F. P., Hartwig, F. P., Monteiro, G. A., Maziero, R. R. D., Freitas-
 494 Dell'Aqua, C. P., Alvarenga, M. A., Papa, F. O., Dell'Aqua, J. A., 2014. Use of
 495 cholesterol-loaded cyclodextrin: An alternative for bad cooler stallions. *Theriogenology*,
 496 81(2), 340–346. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.10.003>
- 497 Hossain, Md. S., Johannisson, A., Wallgren, M., Nagy, S., Siqueira, A. P., Rodriguez-
 498 Martinez, H., 2011. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and
 499 functionality: state of the art. *Asian Journal of Andrology*, 13(3), 406–419.
 500 <https://doi.org/10.1038/aja.2011.15>

- 501 Irmak, G., Demirtaş, T. T., Gümüşderelioğlu, M., 2020. Sustained release of growth
 502 factors from photoactivated platelet rich plasma (PRP). *European Journal of*
 503 *Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 148, 67–76.
 504 <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.11.011>
- 505 Knezevic, N. N., Candido, K. D., Desai, R., Kaye, A. D., 2016. Is Platelet-Rich Plasma
 506 a Future Therapy in Pain Management? *Medical Clinics of North America*, 100(1), 199–
 507 217. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2015.08.014>
- 508 Kumar, D., Naqvi, S. M. K., 2014. Effect of time and depth of insemination on fertility
 509 of Bharat Merino sheep inseminated trans-cervical with frozen-thawed semen. *Journal of*
 510 *Animal Science and Technology*, 56(1), 8. <https://doi.org/10.1186/2055-0391-56-8>
- 511 La Falci, V. S. N., Yrjö-Koskinen, A. E., Fazeli, A., Holt, W. V., Watson, P. F., 2011.
 512 Antioxidant combinations are no more beneficial than individual components in
 513 combating ram sperm oxidative stress during storage at 5°C. *Animal Reproduction*
 514 *Science*, 129(3–4), 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.12.006>
- 515 Laškaj, R., Dodig, S., Čepelak, I., Kuzman, I., 2009. Superoxide dismutase, copper and
 516 zinc concentrations in platelet-rich plasma of pneumonia patients. *Annals of Clinical*
 517 *Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*, 46(2), 123–128.
 518 <https://doi.org/10.1258/acb.2008.008178>
- 519 Magalon, J., Bausset, O., Serratrice, N., Giraudo, L., Aboudou, H., Veran, J., Magalon,
 520 G., Dignat-Georges, F., Sabatier, F., 2014. Characterization and Comparison of 5 Platelet-
 521 Rich Plasma Preparations in a Single-Donor Model. *Arthroscopy: The Journal of*
 522 *Arthroscopic & Related Surgery*, 30(5), 629–638.
 523 <https://doi.org/10.1016/j.arthro.2014.02.020>

- 524 Marx, R. E., 2004. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *Journal of Oral and*
 525 *Maxillofacial Surgery*, 62(4), 489–496. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2003.12.003>
- 526 Maxwell, W. M. C., Watson, P. F., 1996. Recent progress in the preservation of ram
 527 semen. *Animal Reproduction Science*, 42(1–4), 55–65. [https://doi.org/10.1016/0378-](https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01544-8)
 528 4320(96)01544-8
- 529 McNicol, A., Israels, S. J., 1999. Platelet Dense Granules. *Thrombosis Research*, 95(1),
 530 1–18. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(99\)00015-8](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(99)00015-8)
- 531 Merati, Z., Farshad, A., 2021. Supplementary role of vitamin E and amino acids added to
 532 diluent on goat sperm freezability. *Cryobiology*, 100, 151–157.
 533 <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.02.004>
- 534 Merchán, W. H., Gómez, L. A., Chasoy, M. E., Alfonso-Rodríguez, C. A., Muñoz, A. L.,
 535 2019. Platelet-rich plasma, a powerful tool in dermatology. *Journal of Tissue Engineering*
 536 *and Regenerative Medicine*, 13(5), 892–901. <https://doi.org/10.1002/TERM.2832>
- 537 Motlagh, M. K., Sharafi, M., Zhandi, M., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Shakeri, M.,
 538 Soleimani, M., Zeinoaldini, S., 2014. Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus*
 539 *officinalis* L.) extract in soybean lecithin-based semen extender following freeze–thawing
 540 process of ram sperm. *Cryobiology*, 69(2), 217–222.
 541 <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.07.007>
- 542 Mouanness, M., Ali-Bynom, S., Jackman, J., Seckin, S., Merhi, Z., 2021. Use of Intra-
 543 uterine Injection of Platelet-rich Plasma (PRP) for Endometrial Receptivity and
 544 Thickness: a Literature Review of the Mechanisms of Action. *Reproductive Sciences*,
 545 28(6), 1659–1670. <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00579-2>

- 546 Nabavinia, M. S., Yari, A., Ghasemi-Esmailabad, S., Gholoobi, A., Gholizadeh, L., Nabi,
 547 A., Lotfi, M., Khalili, M. A., 2023. Improvement of human sperm properties with platelet-
 548 rich plasma as a cryoprotectant supplement. *Cell and Tissue Banking*, 24(2), 307–315.
 549 <https://doi.org/10.1007/S10561-022-10032-6/FIGURES/6>
- 550 Nogueira, B. G., Bitencourt, J. L., Sampaio, B. F. B., Bender, E. S. C., Costa e Silva, E.
 551 V., Zúccarti, C. E. S. N., 2014. Peroxidação lipídica e agentes antioxidantes no sêmen de
 552 mamíferos. *Revista Eletronica de Veterinária*, 15(1), 1–15.
- 553 Padilha, R. T., Magalhães-Padilha, D. M., Cavalcante, M. M., Almeida, A. P., Haag, K.
 554 T., Gastal, M. O., Nunes, J. F., Rodrigues, A. P. R., Figueiredo, J. R., Oliveira, M. A. L.,
 555 2012. Effect of insulin-like growth factor-I on some quality traits and fertility of
 556 cryopreserved ovine semen. *Theriogenology*, 78(4), 907–913.
 557 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.04.005>
- 558 Palacín, I., Yániz, J. L., Fantova, E., Blasco, M. E., Quintín-Casorrán, F. J., Sevilla-Mur,
 559 E., Santolaria, P., 2012. Factors affecting fertility after cervical insemination with cooled
 560 semen in meat sheep. *Animal Reproduction Science*, 132(3–4), 139–144.
 561 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.05.005>
- 562 Palacios, C., Abecia, J. A., 2015. Meteorological variables affect fertility rate after
 563 intrauterine artificial insemination in sheep in a seasonal-dependent manner: a 7-year
 564 study. *International Journal of Biometeorology*, 59(5), 585–592.
 565 <https://doi.org/10.1007/s00484-014-0872-y>
- 566 Parrish, J. J., Susko-Parrish, J., Winer, M. A., First, N. L., 1988. Capacitation of Bovine
 567 Sperm by Heparin1. *Biology of Reproduction*, 38(5), 1171–1180.
 568 <https://doi.org/10.1095/biolreprod38.5.1171>

- 569 Pietrzak, W. S., Eppley, B. L., 2005. Platelet rich plasma: Biology and new technology.
 570 *Journal of Craniofacial Surgery*, 16(6), 1043–1054.
 571 <https://doi.org/10.1097/01.SCS.0000186454.07097.BF>
- 572 Pinheiro, J. C. M. N., Souza, C. N., Toma, H. S., Muraro, L. S., Xavier, A. B. S., Santos,
 573 M. D., Carvalho, A. M., 2021. Uso do plasma rico em plaquetas na reparação tendínea
 574 em ovinos. *Medicina Veterinária (UFRPE)*, 15(4), 324–331.
 575 <https://doi.org/10.26605/medvet-v15n4-3591>
- 576 PUGH, D. G., 2004. *Clínica de ovinos e caprinos* (Roca).
- 577 Reghini, M. F. S., Ramires Neto, C., Segabinazzi, L. G., Castro Chaves, M. M. B.,
 578 Dell'Aqua, C. de P. F., Bussiere, M. C. C., Dell'Aqua, J. A., Papa, F. O., Alvarenga, M.
 579 A., 2016. Inflammatory response in chronic degenerative endometritis mares treated with
 580 platelet-rich plasma. *Theriogenology*, 86(2), 516–522.
 581 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.01.029>
- 582 Ridler, A. L., West, D. M., 2010. Examination of teeth in sheep health management. *Small*
 583 *Ruminant Research*, 92(1–3), 92–95. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.04.014>
- 584 Riesco, M. F., Alvarez, M., Anel-Lopez, L., Neila-Montero, M., Palacin-Martinez, C.,
 585 Montes-Garrido, R., Boixo, J. C., de Paz, P., Anel, L., 2021. Multiparametric Study of
 586 Antioxidant Effect on Ram Sperm Cryopreservation—From Field Trials to Research
 587 Bench. *Animals*, 11(2), 283. <https://doi.org/10.3390/ani11020283>
- 588 Rosa, J. de L., Freitas Dell'Aqua, C. de P., Souza, F. F., Missassi, G., Kempinas, W. D.
 589 G., 2023. Multiple flow cytometry analysis for assessing human sperm functional

- characteristics. *Reproductive Toxicology*, *117*, 108353.
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2023.108353>
- Segabinazzi, L. G., Friso, A. M., Correal, S. B., Crespilho, A. M., Dell'Aqua, J. A., Miró, J., Papa, F. O., Alvarenga, M. A., 2017. Uterine clinical findings, fertility rate, leucocyte migration, and COX-2 protein levels in the endometrial tissue of susceptible mares treated with platelet-rich plasma before and after AI. *Theriogenology*, *104*, 120–126.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.08.007>
- Sikka, S., 2001. Relative Impact of Oxidative Stress on Male Reproductive Function. *Current Medicinal Chemistry*, *8*(7), 851–862.
<https://doi.org/10.2174/0929867013373039>
- Soliman, A. F., Saif-Elnasr, M., Abdel Fattah, S. M., 2019. Platelet-rich plasma ameliorates gamma radiation-induced nephrotoxicity via modulating oxidative stress and apoptosis. *Life Sciences*, *219*, 238–247. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.01.024>
- Ustuner, B., Alcay, S., Toker, M. B., Nur, Z., Gokce, E., Sonat, F. A., Gul, Z., Duman, M., Ceniz, C., Uslu, A., Sagirkaya, H., Soyly, M. K., 2016. Effect of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) seminal plasma on the post-thaw quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based or egg yolk-based extender. *Animal Reproduction Science*, *164*, 97–104.
<https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2015.11.017>
- Vannelli, B. G., Barni, T., Orlando, C., Natali, A., Serio, M., & Balboni, G. C., 1988. Insulin-like growth factor-1 (IGF-I) and IGF-I receptor in human testis: an immunohistochemical study. *Fertility and Sterility*, *49*(4), 666–669.
[https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)59837-9](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)59837-9)

- 613 Wathes, D. C., Abayasekara, D. R. E., Aitken, R. J., 2007. Polyunsaturated Fatty Acids in
614 Male and Female Reproduction1. *Biology of Reproduction*, 77(2), 190–201.
615 <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.060558>
- 616 Woodward, E. M., Troedsson, M. H. T., 2015. Inflammatory mechanisms of endometritis.
617 *Equine Veterinary Journal*, 47(4), 384–389. <https://doi.org/10.1111/evj.12403>
- 618 Yan, B., Zhang, Y., Tian, S., Hu, R., Wu, B., 2021. Effect of autologous platelet-rich
619 plasma on human sperm quality during cryopreservation. *Cryobiology*, 98, 12–16.
620 <https://doi.org/10.1016/J.CRYOBIOL.2021.01.009>
- 621 Yue, D., Yan, L., Luo, H., Xu, X., Jin, X., 2010. Effect of Vitamin E supplementation on
622 semen quality and the testicular cell membranal and mitochondrial antioxidant abilities
623 in Aohan fine-wool sheep. *Animal Reproduction Science*, 118(2–4), 217–222.
624 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.08.004>
- 625 Zhu, Y., Yuan, M., Meng, H. Y., Wang, A. Y., Guo, Q. Y., Wang, Y., Peng, J., 2013. Basic
626 science and clinical application of platelet-rich plasma for cartilage defects and
627 osteoarthritis: a review. *Osteoarthritis and Cartilage*, 21(11), 1627–1637.
628 <https://doi.org/10.1016/J.JOCA.2013.07.017>
- 629

Tables

Table 1 - Mean $\pm$ standard error of post-thaw seminal parameters evaluated by CASA with or without the addition of autologous platelet-rich plasma (PRP) in sheep

Variable	PRP Concentration ($\times 10^6/\text{mL}$)				
	CON	10	20	40	PLA
MT (%)	65.9 $\pm$ 5.3	65.6 $\pm$ 4.4	62.7 $\pm$ 5.4	62.1 $\pm$ 4.9	64.8 $\pm$ 3.9
MP (%)	37.5 $\pm$ 3.2	36.6 $\pm$ 3.9	34.9 $\pm$ 4.0	35.4 $\pm$ 3.9	38.1 $\pm$ 3.4
VAP($\mu\text{m/s}$)	91.3 $\pm$ 2.5	90.3 $\pm$ 2.5	88.3 $\pm$ 3.2	90.1 $\pm$ 2.2	89.9 $\pm$ 2.9
VSL($\mu\text{m/s}$)	77.7 $\pm$ 3.1	77.7 $\pm$ 2.5	75.3 $\pm$ 3.4	77.2 $\pm$ 2.4	77.1 $\pm$ 2.5
VCL($\mu\text{m/s}$)	138.6 $\pm$ 3.9	136.2 $\pm$ 3.9	135.3 $\pm$ 4.6	138.7 $\pm$ 3.5	138.4 $\pm$ 5.8
ALH(μm)	5.2 $\pm$ 0.2	5.1 $\pm$ 0.1	5.2 $\pm$ 0.2	5.4 $\pm$ 0.2	5.3 $\pm$ 0.2
BCF(Hz)	36.3 $\pm$ 0.9	35.5 $\pm$ 0.8	35.9 $\pm$ 0.9	36.1 $\pm$ 0.7	35.6 $\pm$ 0.5
STR(%)	81.8 $\pm$ 1.0	83.0 $\pm$ 1.3	82.0 $\pm$ 1.2	82.2 $\pm$ 1.2	82.7 $\pm$ 0.8
LIN(%)	56.2 $\pm$ 1.6	57.3 $\pm$ 1.4	56.1 $\pm$ 1.6	55.9 $\pm$ 1.7	56.4 $\pm$ 1.4
RAP(%)	45.7 $\pm$ 5.2	44.7 $\pm$ 4.3	41.7 $\pm$ 4.6	41.7 $\pm$ 4.5	45.2 $\pm$ 4.1
MED(%)	10.4 $\pm$ 0.8	10.2 $\pm$ 0.9	10.1 $\pm$ 0.9	9.4 $\pm$ 0.7	9.5 $\pm$ 1.0
SLOW(%)	11.2 $\pm$ 0.7	10.7 $\pm$ 0.9	11.2 $\pm$ 0.9	11.0 $\pm$ 0.9	10.2 $\pm$ 0.9

MT: total motility; MP: progressive motility; VAP: average path velocity; VCL: curvilinear velocity; VSL: progressive linear velocity; ALH: lateral head displacement amplitude; BCF: tail beat frequency; STR: straightness; LIN: linearity; RAP: percentage of sperm with rapid movement; MED: percentage of sperm with medium movement; SLOW: percentage of sperm with slow movement. CON: Botubov® control group; 10: group with 10×10^6 platelets/mL; 20: group with 20×10^6 platelets/mL; 40: group with 40×10^6 platelets/mL; PLA: group with addition of plasma only

Table 2 - Mean $\pm$ standard error of post-thaw seminal parameters incubated for 3 hours at 37°C and evaluated by CASA with or without the addition of autologous platelet-rich plasma (PRP) in sheep

Variable	PRP Concentration (x10 ⁶ /mL)				
	CON	10	20	40	PLA
MT(%)	47.0 $\pm$ 7.0	45.8 $\pm$ 5.6	44.6 $\pm$ 6.6	41.3 $\pm$ 6.3	42.2 $\pm$ 6.5
MP(%)	28.2 $\pm$ 5.2	26.7 $\pm$ 3.9	26.4 $\pm$ 4.8	25.1 $\pm$ 4.7	24.5 $\pm$ 4.2
VAP(μ m/s)	78.1 $\pm$ 4.0	77.4 $\pm$ 2.8	75.4 $\pm$ 3.0	72.4 $\pm$ 3.0	72.2 $\pm$ 2.9
VSL(μ m/s)	66.2 $\pm$ 3.4	66.7 $\pm$ 2.5	64.2 $\pm$ 2.5	61.3 $\pm$ 2.9	62.2 $\pm$ 2.3
VCL(μ m/s)	125.7 $\pm$ 6.3	123.6 $\pm$ 5.0	120.8 $\pm$ 5.8	117.9 $\pm$ 4.3	115.5 $\pm$ 5.0
ALH(μ m)	5.2 $\pm$ 0.2	5.3 $\pm$ 0.2	5.1 $\pm$ 0.2	5.2 $\pm$ 0.1	4.9 $\pm$ 0.2
BCF(Hz)	32.8 $\pm$ 0.8	32.5 $\pm$ 0.6	32.7 $\pm$ 0.6	31.9 $\pm$ 0.8	32.6 $\pm$ 0.5
STR(%)	83.4 $\pm$ 1.2	86.7 $\pm$ 0.9	84.6 $\pm$ 1.2	83.4 $\pm$ 1.0	85.1 $\pm$ 1.1
LIN(%)	55.9 $\pm$ 1.7	56.1 $\pm$ 1.5	56.9 $\pm$ 1.8	54.6 $\pm$ 1.4	56.9 $\pm$ 1.4
RAP(%)	33.1 $\pm$ 6.2	30.6 $\pm$ 4.4	30.7 $\pm$ 5.5	27.7 $\pm$ 5.2	27.2 $\pm$ 5.1
MED(%)	7.2 $\pm$ 1.0	8.0 $\pm$ 1.0	7.5 $\pm$ 1.0	7.7 $\pm$ 1.0	6.9 $\pm$ 1.0
SLOW(%)	6.7 $\pm$ 0.7	7.2 $\pm$ 0.9	6.5 $\pm$ 1.0	5.6 $\pm$ 0.7	6.5 $\pm$ 1.2

MT: total motility; MP: progressive motility; VAP: average path velocity; VCL: curvilinear velocity; VSL: progressive linear velocity; ALH: lateral head displacement amplitude; BCF: tail beat frequency; STR: straightness; LIN: linearity; RAP: percentage of sperm with rapid movement; MED: percentage of sperm with medium movement; SLOW: percentage of sperm with slow movement. CON: Botubov® control group; 10: group with 10x10⁶ platelets/mL; 20: group with 20x10⁶ platelets/mL; 40: group with 40x10⁶ platelets/mL; PLA: group with addition of plasma only.

Table 3 - Mean $\pm$ standard error of seminal parameters (CASA) post-thaw with or without the addition of autologous platelet-rich plasma (PRP) for the 4 sheep that showed differences in flow cytometry analyses.

Variable	PRP Concentration (x10 ⁶ /mL)				
	CON	10	20	40	PLA
MT(%)	58.4 $\pm$ 7.6	58.5 $\pm$ 5.9	63.4 $\pm$ 8.3	57.4 $\pm$ 8.2	66.1 $\pm$ 2.7
MP(%)	29.1 $\pm$ 5.7	30.5 $\pm$ 3.6	34.0 $\pm$ 5.9	31.7 $\pm$ 6.5	38 $\pm$ 4.2
VAP(μ m/s)	87.6 $\pm$ 3.9	87.6 $\pm$ 4.5	84.7 $\pm$ 4.6	88.9 $\pm$ 3.9	90.2 $\pm$ 4.7
VSL(μ m/s)	73.3 $\pm$ 4.9	75.2 $\pm$ 4.4	71.8 $\pm$ 4.8	76.5 $\pm$ 4.6	77.5 $\pm$ 4.1
VCL(μ m/s)	133.7 $\pm$ 6.0	130.9 $\pm$ 6.6	130.3 $\pm$ 7.7	136.6 $\pm$ 6.3	138.9 $\pm$ 8.7
ALH(μ m)	5.3 $\pm$ 0.3	5.1 $\pm$ 0.3	5.2 $\pm$ 0.4	5.4 $\pm$ 0.3	5.4 $\pm$ 0.4
BCF(Hz)	34.6 $\pm$ 1.4	34.3 $\pm$ 1.4	35.6 $\pm$ 1.4	35.7 $\pm$ 1.3	35.9 $\pm$ 0.8
STR(%)	80 $\pm$ 2.3	82.2 $\pm$ 1.5	81.7 $\pm$ 1.9	82 $\pm$ 1.8	82.6 $\pm$ 1.5
LIN(%)	55.0 $\pm$ 2.9	57.4 $\pm$ 2.3	56.4 $\pm$ 2.6	56.2 $\pm$ 3.1	56.5 $\pm$ 2.7
RAP(%)	35.8 $\pm$ 6.3	36.4 $\pm$ 4.8	40.4 $\pm$ 6.9	36.9 $\pm$ 7.3	44.8 $\pm$ 4.6
MED(%)	10.4 $\pm$ 1.2	11.0 $\pm$ 1.4	11.1 $\pm$ 1.6	9.4 $\pm$ 0.8	10.7 $\pm$ 1.7
SLOW(%)	12.2 $\pm$ 1.0	11.5 $\pm$ 1.3	12.2 $\pm$ 1.4	11.1 $\pm$ 1.6	10.7 $\pm$ 1.3

MT: total motility; MP: progressive motility; VAP: average path velocity; VCL: curvilinear velocity; VSL: progressive linear velocity; ALH: lateral head displacement amplitude; BCF: tail beat frequency; STR: straightness; LIN: linearity; RAP: percentage of sperm with rapid movement; MED: percentage of sperm with medium movement; SLOW: percentage of sperm with slow movement. CON: Botubov® control group; 10: group with 10x10⁶ platelets/mL; 20: group with 20x10⁶ platelets/mL; 40: group with 40x10⁶ platelets/mL; PLA: group with addition of plasma only.

Table 4 - Mean $\pm$ standard error of the evaluations performed by flow cytometry for plasma membrane and acrosome integrity, plasma membrane stability, and mitochondrial potential of all sheep (n=8) and the selected animals (n=4)

Flow cytometry evaluations		PRP Concentration (x10 ⁶ /mL)					P- Value
	n=8	CON	10	20	40	PLA	
PLASMATIC AND ACROSSOMAL MEMBRANE INTEGRITY (%)		46.8 $\pm$ 3.6	51.8 $\pm$ 4.6	51.9 $\pm$ 3.9	53.1 $\pm$ 4.5	54.8 $\pm$ 4.8	ns
CELLS WITH STABLE PLASMATIC MEMBRANE (%)		50.3 $\pm$ 4.1	53.2 $\pm$ 4.9	51.4 $\pm$ 3.6	51.8 $\pm$ 4.1	58.0 $\pm$ 5.3	ns
HIGH MITOCHONDRIAL POTENTIAL (HPM, %)		59.7 $\pm$ 5.2	62.4 $\pm$ 5.3	59.3 $\pm$ 3.9	57.0 $\pm$ 4.9	65.1 $\pm$ 5.6	ns
				10,446 $\pm$ 42	10,502 $\pm$ 515	11,175 $\pm$ 760	ns
MITOCHONDRIAL POTENTIAL STABLE (UA)		11,607 $\pm$ 595.4	10,943 $\pm$ 669.1	8.3	.6	.1	
					11,042 $\pm$ 535	11,693 $\pm$ 748	ns
MITOCHONDRIAL POTENTIAL HPM (UA)		12,329 $\pm$ 634.5	11,547 $\pm$ 715.6	11,030 $\pm$ 441	.1	.4	
n=4							
PLASMATIC AND ACROSSOMAL MEMBRANE INTEGRITY (%)		41.6 $\pm$ 4.3b	55.1 $\pm$ 6.4ab	55.3 $\pm$ 5.3ab	57.5 $\pm$ 4.3ab	64.6 $\pm$ 3.4a	0.02
CELLS WITH STABLE PLASMATIC MEMBRANE (%)		44.7 $\pm$ 6.0b	53.9 $\pm$ 7.6ab	53.6 $\pm$ 7.6ab	58.1 $\pm$ 4.8ab	68.3 $\pm$ 4.1a	0.03
HIGH MITOCHONDRIAL POTENTIAL (%)		53.1 $\pm$ 8.0	61.8 $\pm$ 7.3	60.6 $\pm$ 5.4	60.8 $\pm$ 5.7	74.1 $\pm$ 4.1	ns
				11,129 $\pm$ 736	11,704 $\pm$ 690	12,902 $\pm$ 117	ns
MITOCHONDRIAL POTENTIAL STABLE (UA)		12,678 $\pm$ 869	11,360 $\pm$ 1129	.5	.2	2	
				11,619 $\pm$ 771	12,132 $\pm$ 747	13,270 $\pm$ 116	ns
MITOCHONDRIAL POTENTIAL HPM (UA)		13,471 $\pm$ 923.2	11,818 $\pm$ 1192	.1	.3	9	

UA, arbitrary units

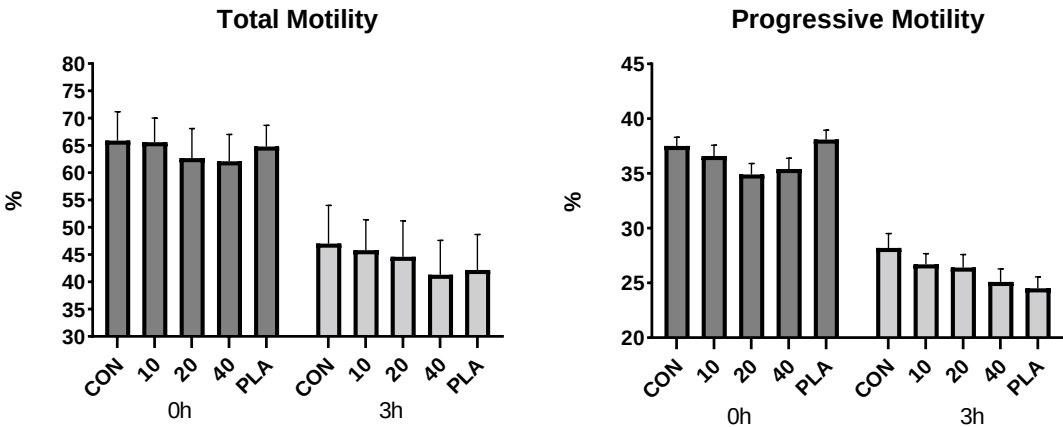
Table 5 - Mean $\pm$ standard error of the evaluations performed by flow cytometry for superoxide ($O_2^{\bullet-}$) production in the mitochondrial matrix and intracellular hydrogen peroxide production of all sheep (n=8) and the selected animals (n=4)

Flow cytometry evaluations <i>n</i> =8	PRP Concentration (x10 ⁶ /mL)					P-Value
	CON	10	20	40	PLA	
ANION SUPEROXIDE GENERATION (O_2 , %)	51.1 $\pm$ 3.2	49.6 $\pm$ 4.2	48.8 $\pm$ 3.0	48.6 $\pm$ 3.9	44.6 $\pm$ 4.4	ns
ANION SUPEROXIDE GENERATION, TOTAL CELLS (UA)	504.3 $\pm$ 58.8	509.5 $\pm$ 67.5	469.9 $\pm$ 50.9	453.6 $\pm$ 54.2	399.4 $\pm$ 61.2	ns
ANION SUPEROXIDE GENERATION (O_2 , UA)	1,060 $\pm$ 74.3	1,075 $\pm$ 64.3	1,076 $\pm$ 56.1	1,082 $\pm$ 57.4	1,021 $\pm$ 65.7	ns
HYDROGEN PEROXIDE GENERATION, TOTAL CELLS (H_2O_2 , UA)	329.2 $\pm$ 61.7	311.4 $\pm$ 48.6	361.4 $\pm$ 66.2	331.7 $\pm$ 50.7	315.3 $\pm$ 57.4	ns
HYDROGEN PEROXIDE GENERATION, DEAD CELLS (H_2O_2 , UA)	351.7 $\pm$ 67.2	338.4 $\pm$ 56.1	381.3 $\pm$ 72.9	353.5 $\pm$ 58.2	345.9 $\pm$ 64.3	ns
HYDROGEN PEROXIDE GENERATION, LIVE CELLS (H_2O_2 , UA)	323.4 $\pm$ 58.1	312.3 $\pm$ 47.2	357.8 $\pm$ 62.8	327.9 $\pm$ 46.8	300.9 $\pm$ 54.6	ns
<i>n</i> =4						
ANION SUPEROXIDE GENERATION (O_2 , %)	57.8 $\pm$ 4.8a	47.5 $\pm$ 6.9ab	46.4 $\pm$ 3.6ab	44.4 $\pm$ 4.2ab	38.5 $\pm$ 2.4b	0.08
ANION SUPEROXIDE GENERATION, TOTAL CELLS (UA))	618.4 $\pm$ 100.6	534.8 $\pm$ 121.2	425.5 $\pm$ 67.3	399 $\pm$ 61.8	311.8 $\pm$ 30.1	ns
ANION SUPEROXIDE GENERATION (O_2 , UA)	1,255 $\pm$ 94.2	1,188 $\pm$ 113.6	1,169 $\pm$ 87.7	1,175 $\pm$ 92.1	1,089 $\pm$ 114.2	ns
HYDROGEN PEROXIDE GENERATION, TOTAL CELLS (H_2O_2 , UA)	384 $\pm$ 118	375.4 $\pm$ 89.0	461.4 $\pm$ 122.3	396.8 $\pm$ 92.7	380.4 $\pm$ 108.7	ns
HYDROGEN PEROXIDE GENERATION, DEAD CELLS (H_2O_2 , UA)	402.4 $\pm$ 123b	409.4 $\pm$ 100.5ab	498.3 $\pm$ 132.5a	420.8 $\pm$ 107.1ab	414.6 $\pm$ 119.1ab	0.05
HYDROGEN PEROXIDE GENERATION, LIVE CELLS (H_2O_2 , UA)	376.3 $\pm$ 112.6	368.8 $\pm$ 86.5	442.1 $\pm$ 118	387.5 $\pm$ 87.4	365.4 $\pm$ 104.1	ns

UA, arbitrary units

1 Figures

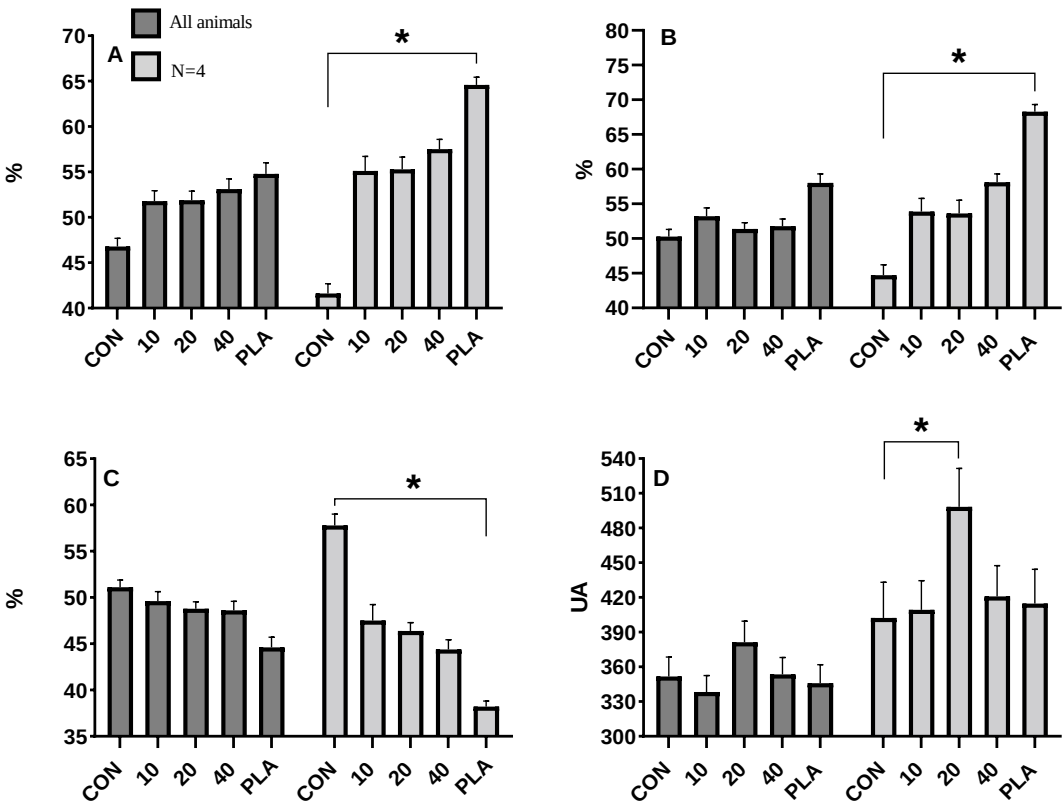
2



3

4 Figura 3 - Total and progressive motility (%) post-thaw (0h) and after 3 hours of
5 incubation at 37°C (thermotolerance test - TTR)

6



7

8 Figure 4 - Flow cytometry analysis. A. Percentage of cells with intact plasma and
9 acrosomal membrane; B. Percentage of cells with membrane stability; C. Percentage of
10 cells with high O2 production; D. Concentration of H2O2 in damaged cells, measured by
11 the intensity of fluorescence emitted by the cells (UA, arbitrary units). *statistical
12 difference between groups.

13