



1
2
3
4
5 **UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**
6 **PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**
7 **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E**
8 **REPRODUÇÃO DE RUMINANTES**
9

10
11
12
13
14 **UTILIZAÇÃO DE UM DILUIDOR À BASE DE LECITINA DE SOJA EM**
15 **DIFERENTES CONCENTRAÇÕES PARA CRIOPRESERVAÇÃO**
16 **DO SEMÊN OVINO**
17

18
19
20 **WILTON ARRUDA GOMES**
21

22
23
24 **GARANHUNS - PE**

25 **2016**
26

27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E
REPRODUÇÃO DE RUMINANTES

UTILIZAÇÃO DE UM DILUIDOR À BASE DE LECITINA DE SOJA EM
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES PARA CRIOPRESERVAÇÃO
DO SEMÊN OVINO

WILTON ARRUDA GOMES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Sanidade e Reprodução de Ruminantes.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Madalena Pessoa Guerra

GARANHUNS - PE

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

53

54

55

56 Dissertação à disposição na Biblioteca Central da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

57 A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às

58 normas de ética científica.

59

60

61

62

A778p Gomes, Wilton Arruda Gomes

63

Utilização De Um Diluidor À Base De Lecitina De Soja Em Diferentes

64

Concentrações Para Criopreservação Do Semên Ovino/Wilton Arruda Gomes. --

65

Recife, __2016.

66

34 f.: il.

67

Orientador (a): Maria Madalena Pessoa Guerra.

68

Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução
de Ruminantes) – Universidade Federal Rural de

69

Pernambuco.

70

Recife, 2016.

71

Referências.

72

1. Criopreservação 2. Antioxidantes 3. Sêmen 4. Lecitina de Soja

73

5. Ovinos I. Guerra, Maria Madalena Pessoa,

72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO
DE RUMINANTES**

**UTILIZAÇÃO DE UM DILUIDOR À BASE DE LECITINA DE SOJA EM
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES PARA CRIOPRESERVAÇÃO
DO SEMÊN OVINO**

Dissertação elaborada por

WILTON ARRUDA GOMES

Aprovada em 29 de fevereiro de 2016

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Madalena Pessoa Guerra (Orientadora) / DMV-UFRPE

Prof^a. Dra. Sildivane Valcácia Silva
Departamento de Biotecnologia/CBiotec - UFPB

Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro
Unidade Acadêmica de Garanhuns – UAG/UFRPE

GARANHUNS - PE

2016

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

Ao invisível mais real (*Deus*),

119

Aos meus pais (*Valdeci Gomes e Severina Arruda*),

120

Ao meu avô (*Zeca Juvenal – in memoriam*),

121

E à minha esposa (*Nathália Gomes*),

122

Dedico.

123

124

Sou eternamente agradecido por tudo!

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

O Senhor é o meu Pas

149

Nada me faltará (Salmos 23.1).

150

AGRADECIMENTOS

151

152 Sou muito grato a Deus, por conceder que todas as coisas aconteçam no tempo certo,
153 neste caso a conclusão de meu mestrado, objetivo tão desejado por mim e importante para
154 minha carreira profissional;

155 Aos meus pais, Valdeci Gomes e Severina Arruda, por sempre serem um exemplo de
156 trabalho, dedicação e honestidade a ser seguido por mim;

157 À minha esposa, Nathália Gomes, por sua paciência, amor e carinho que sempre teve
158 comigo;

159 À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Madalena Guerra, pela oportunidade dada para que eu
160 fizesse o mestrado sob sua orientação, e não só no mestrado, mas durante boa parte de minha
161 vida acadêmica;

162 Aos meus amigos do ANDROLAB, Lúcia Cristina Arruda, Robespierre Araújo, André
163 Mariano, Ígor Nery, Helder Melo, Milena Monteiro, Bruna Sabino, Thalles Maciel, Ellen
164 Cordeiro e Sildivane Valcácia, sendo bem objetivo: turma “diferente e extraordinária”;

165 Aos meus queridos professores Cláudio Coutinho, Gustavo Ferrer, José Wilton Jr,
166 Carla Lopes e Pierre Castro, que de alguma forma puderam contribuir para que eu chegasse
167 até aqui e por fornecerem uma parte de seu conhecimento, adquiridos por mim durante todo
168 esse tempo;

169 Aos meus grandes amigos e parceiros de graduação, Felipe Sales, Paulo Povoas,
170 Guilherme Veras, Rodrigo Novaes, Adilson Conrado, Laiano e Leonardo Vaz, David
171 Tenório, pelo companheirismo e amizade.

172

173

Muito obrigado a todos!

174

175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200

LISTA DE ABREVIATURAS

- CASA – Computer assisted system analysis
- CEUA – Comissão de ética para uso de animais
- CFDA – Diacetato de carboxifluoresceína
- DHA – Ácido docosahexanoico
- DP – Desvio padrão
- DMSO – Dimetilsufóxido
- FITC-PNA – Isotiocianato de fluoresceína conjugado a *Peanut agglutinin*
- IA – Inseminação artificial
- iAC – Integridade de acrossoma
- iMP – Integridade de membrana plasmática
- IMPA – Integridade de membrana plasmática e acrossomal
- IP – Iodeto de propídio
- LDL – Lipoproteína de baixa densidade
- LIN - Linearidade
- LS – Lecitina de soja
- MP – Motilidade progressiva
- MT – Motilidade total
- pH – Potencial hidrogeniônico
- PMM – Potencial de membrana mitocondrial
- STR – Retilinearidade
- UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco
- VAP – Velocidade média do percurso
- VSL – Velocidade em linha reta

201

RESUMO

202

203 O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da utilização de um diluidor à base de lecitina de
204 soja [1% (LS1), 2% (LS2) e 3% (LS3)] no sêmen congelado ovino em diferentes
205 concentrações (100×10^6 e 200×10^6). Para tanto, foram utilizados quatro ovinos em idade
206 reprodutiva, dos quais o sêmen foi obtido com vagina artificial. Após análise e aprovação do
207 sêmen acima de 70% de motilidade, foi constituído o *pool* seminal, o qual foi utilizado no
208 processamento. Cada *pool* foi submetido a quatro tratamentos, de acordo com diferentes
209 concentrações de lecitina e concentrações espermáticas: Gema de ovo (G100 e G200);
210 Lecitina de soja a 1% (LS1 100 e LS1 200); Lecitina de Soja a 2% (LS2 100 e LS2 200) e
211 Lecitina de Soja a 3% (LS3 100 e LS3 200). Para congelação, as palhetas (0,25 mL) foram
212 congeladas em máquina de congelação, na curva de congelação $-0,25 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ até atingir
213 $5 \text{ }^\circ\text{C}$, seguida por estabilização de 2h e nova curva de congelação de $-15 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ até $-120 \text{ }^\circ\text{C}$.
214 Imediatamente após a congelação, as palhetas foram transferidas para o nitrogênio líquido ($-$
215 $196 \text{ }^\circ\text{C}$) e armazenadas em botijão criobiológico. Após descongelação, procedeu-se à análise
216 computadorizada da cinética espermática (CASA), assim como à avaliação da integridade de
217 membrana plasmática (iMP) e acrossomal (iAC), e do potencial de membrana mitocondrial
218 (PMM) por meio de microscopia de fluorescência, utilizando os fluoróforos diacetato de
219 carboxifluoresceína e iodeto de propídio, isotiocianato de fluoresceína conjugado a Peanut
220 agglutinin (FITC-PNA) e JC-1, respectivamente. A análise computadorizada da cinética
221 espermática (CASA) e a avaliação da integridade de membrana plasmática (iMP) e
222 acrossomal (iAC) e do potencial de membrana mitocondrial (PMM) foram determinadas após
223 o descongelamento das palhetas. Foi observado que o grupo gema apresentou motilidade total
224 (MT) superior ($p < 0,05$) aos grupos de lecitina numa concentração espermática de 100×10^6 .
225 Com relação aos parâmetros de: motilidade progressiva (MP), linearidade (LIN) e
226 retilinearidade (STR), tanto na concentração de 100×10^6 quanto na de 200×10^6 , o
227 grupo gema obteve resultados superiores ($p < 0,05$) aos grupos tratados com LS. Com relação a
228 WOB, os grupos LS1 e LS2 apresentaram valores significativa ($p < 0,05$) menores. Na
229 concentração de 200×10^6 , todos os grupos apresentaram resultados menores, em relação à
230 concentração de 100×10^6 . Na VCL, os três grupos tratados com LS foram significativamente
231 ($p < 0,05$) melhores do que o grupo gema, nas duas concentrações (100 e 200×10^6). Os
232 tratamentos com a gema não diferiram ($p > 0,05$) dos tratados com LS nos valores de VSL,
233 VAP e BCF, nas diferentes concentrações. Já no ALH o grupo gema foi inferior ($p < 0,05$) aos
234 tratados com LS, em ambas as concentrações espermáticas. Na análise da integridade das
235 membranas plasmática e acrossomal (IMPA) e do potencial de membrana mitocondrial
236 (PMM), foi observado que no tratamento com LS1 foi significativamente superior ($p < 0,05$) ao
237 grupo gema na concentração de 200×10^6 na IMPA. Também foi observada que o PMM
238 sofreu influência apenas de um tipo de diluidor, a LS1, que foi superior ($p < 0,05$) na
239 concentração do grupo de 200×10^6 . Portanto, pode-se concluir que a lecitina de soja 1%
240 pode ser utilizada como possível substituto à gema de ovo na criopreservação do sêmen
241 ovino.

242 **Palavras-chave: lecitina de soja, criopreservação, sêmen, ovino.**

243

244

245

ABSTRACT

246

247 The objective of this study was to evaluate the effect of using an extender soy lecithin-based
248 [1% (LS1), 2% (LS2) and 3% (LS3)] in frozen ram semen in different concentrations (100×10^6
249 and 200×10^6). To this end, four rams were used in reproductive age and semen samples
250 were collected by artificial vagina. Upon review and approval of semen above 70% motility,
251 it was formed the seminal pool and this used in processing. Each pool was subjected to four
252 treatments, accordance with different lecithin concentrations and sperm concentration: Egg
253 yolk (G100 and G200); Soy lecithin 1% (LS1 100 and 200); Lecithin 2% (LS2 100 and 200)
254 and Soya Lecithin 3% (LS3 100 and 200). For freezing, the straws (0.25 ml) were frozen in
255 freezing machine and were used the freezing curve of $-0.25 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ until reaching $5 \text{ }^\circ\text{C}$,
256 followed by 2h stabilization and freezing new curve $-15 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ to $-120 \text{ }^\circ\text{C}$. Immediately
257 after freezing, the straws were transferred to liquid nitrogen ($-196 \text{ }^\circ\text{C}$) and stored. After
258 thawing, it was proceeded the computerized analysis of sperm kinetics (CASA), as well as
259 assessment of the plasma membrane integrity (iMP) and acrosome (iAC), and mitochondrial
260 membrane potential (MMP) by fluorescence microscopy, using the fluorophores
261 carboxyfluorescein diacetate and propidium iodide, fluorescein isothiocyanate conjugated
262 Peanut agglutinin (PNA-FITC) and JC-1, respectively. Computer analysis of sperm kinetics
263 (CASA) and the evaluation of plasma membrane integrity (iMP) and acrosomal (iAC) and
264 mitochondrial membrane potential (MMP) were determined after thawing of straws. It has
265 been observed that the yolk group showed total motility (TM) higher ($p < 0.05$) than lecithin
266 groups to sperm concentration of 100×10^6 . Regarding parameters: progressive motility (MP),
267 linearity (LIN) and straightness (STR), both at concentration of 100×10^6 and 200×10^6 ,
268 showed superior results obtained with yolk group ($p < 0.05$) than those groups treated with LS.
269 Regarding the WOB, LS1 and LS2 groups showed significant reduction ($p < 0.05$) of results.
270 At concentration of 200×10^6 , all groups showed worse results than those with concentration
271 of 100×10^6 . VCL in the three groups treated with SL were significantly ($p < 0.05$) better than
272 the yolk group at both concentrations (100 and 200×10^6). The treatments with egg-yolk did
273 not differ ($p > 0.05$) to those treated with lecithin in VSL, VAP and BCF values, in different
274 concentrations. In ALH, yolk group was lower ($p < 0.05$) to those treated with LS, in both
275 sperm concentrations. In the analysis of the integrity of the plasma and acrosomal membranes
276 (IMPA) and mitochondrial membrane potential (MMP), it was observed that the treatment
277 LS1 was significantly higher ($p < 0.05$) in the yolk group at concentration of 200×10^6 in
278 IMPA. It was also observed that PMM was influenced only by one type of extender, LS1,
279 which was greater ($p < 0.05$) in concentration of 200×10^6 . Therefore, it was concluded that
280 soy lecithin 1% can be used as a possible replacement for egg yolk in ram semen
281 cryopreservation.

282 **Keywords: soy lecithin, cryopreservation, semen, sheep.**

283

	Página
DEDICATÓRIA	
AGRADECIMENTOS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Criopreservação do sêmen.....	14
2.2 Diluidor do sêmen ovino.....	16
2.2.1. Crioprotetor.....	17
2.2.2 Sistema tampão e osmolaridade.....	18
2.2.3 Açúcares.....	19
2.2.4 Antibióticos.....	20
2.3 Métodos de avaliação espermática.....	20
2.3.1 Sistema computadorizado de análise espermática (CASA).....	20
2.3.2 Análise espermática por Citometria de Fluxo.....	22
3 REFERÊNCIAS.....	25
4 ARTIGO.....	38

286 1 INTRODUÇÃO

287

288 A expansão da ovinocultura no Brasil traz novos desafios na busca de tecnologias que
289 permitam a obtenção de melhores resultados na produção e reprodução de animais dessa
290 espécie. Com a tecnificação do processo reprodutivo, a Inseminação Artificial (IA) é a
291 biotécnica de escolha para obtenção de um maior número de fêmeas prenhes em tempo
292 reduzido (CÂMARA e GUERRA, 2011).

293 O processo de criopreservação pode ser dividido basicamente em duas etapas: a
294 refrigeração, que consiste na redução da temperatura seminal a partir da temperatura ambiente
295 a valores acima de 0 °C; e a congelação, que consiste na redução da temperatura seminal a
296 valores negativos a partir de 0 °C (CRESPILO, 2007). No entanto, a conservação pelo frio,
297 principalmente a congelação, pode provocar danos ultraestruturais, bioquímicos e funcionais
298 nas células espermáticas (LEBOEUF, 2000).

299 Bittencour et al. (2013) já alertaram que tais alterações propostas devem contemplar as
300 características inerentes do sêmen de cada espécie e o conhecimento da variabilidade
301 individual entre animais. Por isso, para que sejam maximizados os índices de fertilidade do
302 sêmen ovino congelado, é importante destacar um adequado processo de criopreservação do
303 sêmen e a condução de todas as etapas de forma integrada.

304 Purdy (2006) destacou a importância do conhecimento da fisiologia espermática nas
305 diferentes espécies, para a obtenção de resultados satisfatórios no processo da
306 criopreservação. Além disso, é preciso ter o conhecimento da interação de componentes no
307 processo da criopreservação e os ganhos obtidos pelos mesmos na reprodução do macho
308 (CÂMARA e GUERRA, 2011).

309 Um dos principais componentes dos diluentes para armazenamento e criopreservação
310 de sêmen de ovinos é a gema de ovo (SALAMON e MAXWELL, 2000). Entretanto, a grande
311 variabilidade na sua composição, o risco de contaminação microbiológica e a transmissão de
312 doenças são desvantagens importantes a serem levadas em consideração na utilização da
313 gema de ovo, como constituinte de um diluente (AIRES et al., 2003). Rota et al. (1999)
314 estudaram a inclusão de emulsificantes, com função de aumentar a disponibilidade dos

315 fosfolipídios da gema de ovo, dando mais condições à membrana plasmática de proteger os
316 espermatozoides contra as alterações promovidas pelo processo de criopreservação.

317 Uma alternativa viável poderia ser a utilização de um diluidor sem a adição de
318 produtos de origem animal (GIL et al., 2003a) e com componentes quimicamente definidos
319 (ZHAO et al., 2009). A lecitina de soja (LS), um fosfolipídio natural composto de uma fração
320 fosfatada da gema de ovo ou de grãos de soja, e livre de patógenos de origem animal, pode ser
321 incluída na composição do diluidor, sendo uma alternativa segura para a substituição dos
322 componentes de origem animal nos diluentes de refrigeração de sêmen (PAZ et al., 2010;
323 VIDAL et al., 2013). Khalifa et al. (2013) estudaram a fertilidade na espécie ovina do sêmen
324 congelado e refrigerado utilizando dois diluidores comerciais à base de lecitina de soja
325 (Bioexcell® x Andromed®) e constataram que ambos podem substituir a gema de ovo.

326 Outros fatores importantes da criopreservação do sêmen ovino e de demais espécies
327 são a concentração espermática da dose inseminante, diluidores e protocolos de congelação
328 (SALAMON e MAXWELL, 2000; TEKIN et al., 2006). Mas não menos importante, as taxas
329 de concentração espermática, também devem ser levadas em consideração e nas diferentes
330 espécies, seja em caninos (PEÑA e LINDE-FORSBERG, 2000), equinos (NASCIMENTO et
331 al., 2008) e em ovinos (ALVAREZ et al., 2012; REKHA et al., 2016).

332 Com base no que foi apresentado, se faz necessária a realização de estudos que
333 esclareçam os efeitos da utilização da lecitina de soja na criopreservação do sêmen ovino sob
334 diferentes concentrações.

335

336

337

338

339

340

341

342 2 REVISÃO DE LITERATURA

343

344 2.1 Criopreservação do sêmen

345

346 A congelação seminal permite a conservação do material genético do macho por
347 longos períodos de tempo (YOSHIDA, 2000), uma vez que cessa a atividade metabólica do
348 espermatozoide. No entanto, esse procedimento é muito estressante para a célula espermática,
349 resultando em mortalidade de 40-50% das células congeladas (WATSON, 2000).

350 As taxas de fertilidade baixas com a utilização de sêmen congelado são originadas
351 devido às alterações que ocorrem nos espermatozoides durante o processo de
352 congelação/descongelação, responsáveis por maiores dificuldades no trânsito espermático,
353 diminuição da capacidade fertilizante e aumento da mortalidade embrionária (ALVAREZ et
354 al., 2012).

355 O choque térmico ocorre durante a refrigeração, quando os espermatozoides são
356 submetidos a uma rápida redução na temperatura para valores próximos a 0 °C. Os efeitos
357 deletérios do choque térmico são decorrentes dos danos às membranas espermáticas, e tais
358 danos provavelmente estão relacionados à fase de transição lipídica da membrana do
359 espermatozoide (HOLT, 2000a; WATSON, 2000). De acordo com Holt (2000b), Salamon e
360 Maxwell (2000), o choque térmico pode ser minimizado pela utilização de curvas lentas de
361 refrigeração. Deste modo, é comum que o sêmen submetido a refrigeração possa apresentar
362 fertilidade inferior à do sêmen *in natura* (MURGAS et al., 2002), em virtude das injúrias
363 ocorridas, principalmente durante a criopreservação (SILVA e GUERRA, 2011).

364 Por este motivo, o conhecimento e domínio de técnicas que permitam uma análise
365 mais aprofundada da célula espermática *in vitro* são de extrema importância, principalmente
366 para aumentar o conhecimento da fisiologia espermática, que sofre interferência direta de
367 vários aspectos, evitando, assim, insucessos nos programas de IA (BERGSTEIN, 2014). Tal
368 conhecimento permitirá a avaliação das lesões espermáticas geradas durante o processo de
369 criopreservação, que podem ser atribuídas a mudanças de temperatura, formação de grandes
370 cristais de gelo, danos oxidativos, alterações na membrana ou DNA, toxicidade do
371 crioprotetor e estresse osmótico (MELO, 2003). Silva e Guerra (2011) destacaram a

372 padronização de protocolos para a congelação, com o objetivo de minimizar os efeitos
373 deletérios durante o processo de criopreservação.

374 Durante a criopreservação, a membrana plasmática do espermatozoide é considerada o
375 local primário de danos celulares (WATSON, 1995). Crioinjúrias ocasionadas pelo
376 procedimento de criopreservação interferem diretamente no transporte e na sobrevivência
377 espermática no trato genital da fêmea (SALAMON e MAXWELL, 1995). Por isso, estas
378 membranas estão diretamente relacionadas com os índices de fertilidade espermática
379 (SCHMITT, 2002; SANTOS, 2005), pois a integridade das membranas plasmática e
380 acrossomal são fundamentais para o funcionamento da célula espermática, sendo essenciais
381 aos processos de capacitação (WATSON, 1995; ORTEGA et al., 2003; ALVES et al., 2005),
382 reação acrossomal, ligação à zona pelúcida e fusão dos gametas, responsáveis pelo processo
383 de fertilização (ALVES et al., 2005).

384 Em situações onde há a refrigeração rápida até a temperatura de 0 °C, os
385 espermatozoides de mamíferos domésticos não sobrevivem, determinando choque térmico e
386 resultando em perda da permeabilidade seletiva da membrana plasmática ao cálcio,
387 promovendo aumento excessivo do nível intracelular, redução da motilidade e determinação
388 de necrose celular (ROBERTSON et al., 1990; BAILEY e BUHR, 1994). Oliveira (2002)
389 relatou que a integridade estrutural da membrana plasmática é determinada pela temperatura e
390 pela solução na qual ela se encontra, sendo fluida na temperatura corporal, decorrente da
391 ampla mobilidade lateral dos fosfolipídios.

392 Da mesma forma, a susceptibilidade à baixa temperatura parece também estar
393 vinculada à alta relação entre ácidos graxos saturados e insaturados presentes na membrana
394 plasmática. Segundo White (1993), espermatozoides bovinos, ovinos e suínos, considerados
395 sensíveis à criopreservação, possuem maior taxa de ácidos graxos saturados e insaturados,
396 quando comparados com as espécies canina e humana.

397 A utilização de um meio diluente à base de lecitina de soja apresenta grande interesse
398 comercial, visando aumentar o percentual de células espermáticas viáveis após a
399 descongelação, além de livres de fontes de contaminação; vislumbrando-se, assim, o acesso
400 ao potencial genético de animais de alto valor zootécnico pelos criadores, o que contribuirá
401 para a melhoria das condições socioeconômicas da Região Nordeste, bem como para abertura

402 e ampliação de novos mercados internacionais para comercialização de germoplasma
403 criopreservado (GIL et al., 2003a; VIDAL et al., 2013).

404 A composição da LS, à base de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina,
405 fosfatidilinositol e ácido fosfatídico (DALMAZZO, 2012), bem como ácidos graxos esteárico,
406 oleico e palmítico, conferem estabilidade à estrutura das membranas biológicas (CRESPILHO
407 et al., 2012), sendo um fator positivo na congelação do sêmen ovino (DEL VALLE, 2012).

408

409 **2.2 Diluidor do sêmen ovino**

410

411 A utilização de diluidores seminais é de extrema importância no sucesso da
412 conservação do sêmen, visando a inseminação artificial (SALAMON e MAXWELL, 2000).
413 Seu uso inadequado pode ocasionar choque osmótico, possibilitando manifestação de
414 alterações morfológicas e diminuição da resistência dos espermatozoides (ABRAHÃO et al.,
415 2004). Várias substâncias vêm sendo estudadas e testadas para o aperfeiçoamento da técnica
416 de criopreservação seminal, com a finalidade de melhorar a viabilidade, a qualidade e a
417 longevidade do sêmen congelado de ovinos (BITTENCOURT et al., 2013).

418 Por isso, para o sucesso da IA é necessário o uso de um bom diluente que contenha
419 nutrientes como reserva de energia; apresente um sistema tampão para evitar alterações de
420 pH; mantenha a pressão osmótica e a concentração de eletrólitos dentro dos padrões
421 fisiológicos do sêmen; previna o crescimento bacteriano; proteja a célula do choque térmico
422 durante o processo de refrigeração; e possua crioprotetores penetrantes que reduzam os danos
423 às células espermáticas durante a congelação e posterior descongelação (SILVA et al., 2000;
424 FUTINO, 2008), além de ser de fácil preparo e baixo custo (CONCANNON e BATISTA,
425 1989; PURDY, 2006).

426

427 2.2.1 Crioprotetor

428

429 Os crioprotetores são substâncias que, quando adicionadas ao diluidor seminal,
430 protegem os espermatozoides dos danos ocasionados durante o processo de criopreservação
431 (CASTELO, 2008; MELO, 2010; DALMAZZO, 2012). Quando exercem sua ação
432 crioprotetora dentro da célula, essas substâncias são chamadas de penetrantes, já quando sua
433 atividade de crioproteção ocorre fora da célula ou na superfície dela, são chamadas de não
434 penetrantes (BITTENCOURT et al., 2013).

435 Entre os crioprotetores espermáticos penetrantes, o glicerol (GL) é o mais utilizado
436 devido à sua eficácia (SMITH e POLGE et al., 1950), com ação tanto intracelular quanto
437 extracelular na proteção das estruturas celulares. O seu efeito crioprotetor é atribuído à sua
438 propriedade coligativa ou de ligação com a água (SALOMON e MAXWELL, 1995),
439 reduzindo a temperatura de congelação do meio intracelular (HAMMERSTEDT et al., 1990)
440 e prevenindo a formação de cristais de gelo. No entanto, o glicerol aumenta o volume de
441 canais de solventes descongelados, dilui as concentrações elevadas de sais (SQUIRES et al.,
442 1999) e diminui a pressão osmótica do meio refrigerado (SALAMON e MAXWELL, 1995).
443 Essas mudanças são deletérias aos espermatozoides, por influenciar a permeabilidade da
444 membrana plasmática, decorrente da desorganização de sua composição lipídica (WATSON,
445 2000).

446 Os crioprotetores não penetrantes têm sua ação extracelular, uma vez que não
447 conseguem atravessar a membrana plasmática da célula, atuando como um soluto e reduzindo
448 a temperatura de congelação do meio (BEZERRA, 2010). Como os açúcares e as
449 lipoproteínas encontradas na gema do ovo e no leite, estes agem apenas no compartimento
450 extracelular. Os açúcares favorecem a desidratação dos espermatozoides, reduzindo a
451 probabilidade de formação de grandes cristais de gelo dentro das células (SQUIRES et al.,
452 1999).

453 A gema de ovo é usada como crioprotetor da membrana plasmática dos
454 espermatozoides em diversas espécies (BITTENCOURT et al., 2013). Os lipídios presentes
455 na gema de ovo são os principais responsáveis pela ação protetora sobre a membrana
456 espermática. O componente essencial de sua ação é a interação desses lipídios da gema do
457 ovo com a membrana espermática, tornando-a mais resistente durante o processo de

458 refrigeração (WATSON, 1995). Porém, a grande variação na composição, o risco de
459 contaminação microbiológica pela possível presença de bactérias e fungos, e a transmissão de
460 doenças são desvantagens importantes a serem levadas em consideração na utilização da
461 gema de ovo no diluente (BITTENCOURT et al., 2008). De acordo com Farstad (2009), a
462 gema não é questionada quanto ao seu efeito crioprotetor, mas quanto a sua origem, que pode
463 veicular possíveis micro-organismos.

464

465 2.2.2 Sistema tampão e osmolaridade

466

467 O aumento da concentração do íon hidrogênio é resultado da atividade metabólica dos
468 espermatozoides. Desta forma, o pH do diluente é reduzido se não houver um mecanismo de
469 remoção desse íon, que diminui a longevidade e a fertilidade espermática (ENGLAND,
470 1993). O pH ótimo para um diluente de sêmen deve estar próximo à neutralidade (entre 6,0 e
471 8,0), enquanto a osmolaridade ideal deve ser igual a de um meio hipertônico (SALAMON e
472 MAXWELL, 2000; JOHNSTON et al., 2001; BEZERRA, 2010).

473 O Tris é o sistema tampão bastante utilizado nos diluentes de sêmen ovino. Ele é uma
474 substância hidrossolúvel e que, comercialmente, está disponível na forma de cristais e em alto
475 grau de pureza, podendo permanecer estável por vários meses em temperatura ambiente,
476 agindo como tampão iônico bipolar em pH entre 7,0 e 9,0 (MCPHAIL e GOODMAN, 1984;
477 CHOE et al., 2006; DORADO et al., 2007a).

478 Outros sistemas tampões para diferentes espécies têm sido utilizadas nos diluentes
479 seminais, tais como Tris (tris-hidroxilaminometano), Tes [N-Tris (hidroximetil) metil-2-
480 aminoetanosulfônico], Test (Tes titulado com Tris), Hepes (ácido etanosulfônico 4-2
481 hidroxietil piperazina-1), Bes [ácido N,N-bis (2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfônico] ou Pipes
482 (piperazina-1,4-bis(2-ácido etanosulfônico)) (FUTINO, 2008). Outra substância que entra na
483 composição de alguns diluentes é o Ácido Cítrico (ácido 2-hidroxi-1,2,3-
484 propanotricarboxílico), pois possui ação antioxidante e tem sido empregado como um
485 conservante natural (GUIMARÃES, 2010). Aguiar et al. (2007) destacaram, ainda, a
486 utilização do PBS (Solução Fosfato Tamponada) como solução tampão dentro dos padrões
487 recomendados para a diluição do sêmen de algumas espécies.

488 Para a diluição de sêmen ovino, pode ser utilizado o diluente TRIS-Gema de Ovo, pois
489 produz elevadas taxas de fertilidade pós-descongelamento (AZERÊDO et al., 2001). Todavia,
490 para Salviano (2008), na diluição utilizando Tris-Gema de Ovo, devem ser adicionados
491 inibidores do crescimento microbiano, fontes nutritivas, estabilizadoras e tamponantes para a
492 manutenção das células espermáticas. A adição de frutose, lactose e gema de ovo têm a
493 função de nutrir os espermatozoides (GUIMARÃES, 2010).

494

495 2.2.3 Açúcares

496

497 Os açúcares também são adicionados ao meio diluente por fornecer o substrato
498 energético aos espermatozoides, manter a pressão osmótica do diluente e promover ação
499 crioprotetora (YILDIZ et al., 2000; RIGAU et al., 2002). Há relatos dos efeitos benéficos de
500 açúcares como a frutose, glicose, rafinose, trealose, sucrose e metil-celulose na motilidade de
501 espermatozoides congelados e descongelados de diversas espécies (DE LEEUW, 1993;
502 HOLT, 2000; YILDIZ et al., 2000; AISEN et al., 2002).

503 O efeito da suplementação de açúcar no diluente sobre a qualidade das células
504 espermáticas criopreservadas vem sendo estudado por muitos pesquisadores. Salamon e
505 Visser (1972) sugeriram que a glicose seria o açúcar mais adequado para adição aos diluentes
506 do sêmen ovino à base de Tris, se comparada à frutose, lactose ou rafinose. Todavia, a adição
507 de dez tipos de açúcares ao diluente Test não melhorou significativamente a sobrevivência das
508 células espermáticas de carneiros, mas foi observada melhor motilidade espermática, pós-
509 descongelamento, ao se utilizar maltose (ABDELHAKEM et al., 1991; NAING et al., 2010).
510 Molinía et al. (1994) afirmaram que não havia diferença na motilidade, pós-descongelamento, de
511 espermatozoides ovinos ao adicionarem açúcares como frutose, glicose, lactose, sacarose ou
512 trealose. Em contrapartida, Yildiz et al. (2000) observaram aumento significativo na taxa de
513 células espermáticas ativas em amostras congeladas e descongeladas de sêmen de cão, quando
514 utilizaram trealose, xilose ou frutose, em comparação a outros açúcares (glicose, lactose,
515 galactose, sacarose, rafinose e maltose).

516 Os açúcares, tais como a glicose, trealose, sacarose, e a rafinose provem um substrato
517 energético, possibilitam a manutenção da pressão osmótica do diluidor e atuam como
518 crioprotetores (HIGASHIYAMA, 2002; YAMASHIRO et al., 2007). Tal escolha deve ser
519 baseada na sua funcionalidade e nas propriedades químicas (PURDY, 2006).

520

521 2.2.4 Antibióticos

522

523 Várias bactérias são identificadas nas amostras de sêmen ovino e algumas podem
524 apresentar efeitos negativos na sua qualidade. Os principais crioprotetores não penetrantes
525 (gema de ovo e/ou leite) utilizados na criopreservação do sêmen apresentam grande
526 susceptibilidade à contaminação bacteriana, com conseqüente comprometimento da qualidade
527 espermática (BITTENCOURT et al., 2013).

528

529 Para controlar o crescimento microbiano, Salamon e Maxwell (2000) indicaram a
530 utilização dos antibióticos penicilina e estreptomicina aos diluidores seminais. Yániz et al.
531 (2010) relataram contaminação do sêmen ovino refrigerado a 15 °C por enterobactérias, que
532 apenas foram sensíveis à gentamicina e ao ceftiofur. Apesar de Bousseau et al. (1998) terem
533 observado que em amostras de diluidores comerciais acrescidos de gema de ovo, associada ou
534 não ao leite, foram encontradas amostras com contaminação moderada, mesmo na presença
535 de antibióticos de largo espectro de ação.

536

537 Diante disso, alguns autores defendem a padronização desses aditivos, evitando
538 variação nas suas composições, estimulando o desenvolvimento de diluidores comerciais à
539 base de LS como uma alternativa à substituição da gema de ovo e do leite, na criopreservação
540 do sêmen ovino (GIL et al., 2003b; FOROUZANFAR et al., 2010).

541

542 **2.3 Métodos de avaliação espermática**

543

544 2.3.1 Sistema Computadorizado de Análise Espermática (CASA)

545

546 Para avaliação da motilidade espermática, principalmente a campo, o método mais
547 utilizado é a determinação subjetiva (percentagem de células móveis), com uso de
548 microscopia óptica. Esse método pode apresentar grande variabilidade e é uma forma indireta
549 de avaliação, apesar de ser considerado simples e de baixo custo (MALMGREN, 1997;
550 VERSTEGEN et al., 2002). É por este motivo que a análise computadorizada da célula

549 espermática (computer-assisted semen analysis - CASA) foi desenvolvida, permitindo a
550 avaliação mais exata e objetiva da motilidade, bem como o fornecimento de informações
551 precisas da cinética da célula espermática (MORTIMER, 1997; COX et al., 2006).

552 O sistema CASA captura e analisa, por meio de um computador, as consecutivas fotos
553 dos espermatozoides, que, quando unidas, formam um filme com o trajeto de cada célula,
554 possibilitando a obtenção de informações mais exatas do movimento individual dos
555 espermatozoides. Tais imagens capturadas são digitalizadas e um *software* forma um vídeo
556 (AMANN e KARTZ, 2004). Este qualifica a amostra não somente quanto à percentagem de
557 células móveis, mas também quantifica as características específicas do movimento
558 espermático (GARNER, 1997). Embora seja o flagelo a parte do espermatozoide que
559 propulsiona o movimento, os sistemas automáticos avaliam o movimento da cabeça, porque é
560 tecnicamente mais fácil acompanhar esse movimento do espermatozoide (MORTIMER,
561 2015).

562 O uso do sistema CASA pode proporcionar uma melhora clínica relevante da
563 avaliação do sêmen, através da integração automatizada dos parâmetros funcionais dos
564 espermatozoides (MORTIMER, 2015).

565 Mortimer e Maxwell (1999) relataram a categorização das células espermáticas quanto
566 ao seu movimento, as quais são classificadas como: móvel não progressivo, linear lento,
567 linear rápido e imóvel. Em 2000, Mortimer destacou os seguintes parâmetros:

- 568 • VAP – velocidade de trajeto ($\mu\text{m/s}$); velocidade curvilínea sobre um trajeto uniforme,
569 desprezando-se o deslocamento lateral da célula espermática. É a velocidade da trajetória
570 média do espermatozoide;
- 571 • VSL – velocidade progressiva ($\mu\text{m/s}$). É a distância considerando-se uma linha reta entre o
572 ponto inicial e o final da trajetória dividida pelo tempo decorrido;
- 573 • VCL – velocidade curvilinear ($\mu\text{m/s}$). É a distância total entre cada posição do centro da
574 célula durante a captura da imagem. É a velocidade da trajetória real do espermatozoide;
- 575 • ALH – amplitude de deslocamento lateral de cabeça (μm). Corresponde à largura média da
576 oscilação da cabeça do espermatozoide durante seu deslocamento. A mensuração desse

577 parâmetro está relacionada com a capacidade de penetração do espermatozoide na zona
578 pelúcida do óvulo. Assim, a ALH é um dos parâmetros que tem efeito sobre a fertilização;

579 • BCF – frequência de batimentos do flagelo (Hz). É determinada pela medida da frequência
580 com que a linha da cabeça espermática atravessa a trajetória celular em qualquer direção;

581 • STR – retilinearidade (%). É a medida do afastamento médio da trajetória da célula
582 espermática, considerando-se uma linha reta. É calculada pela relação entre $VSL/VAP*100$
583 e estima a proximidade do percurso da célula a uma linha reta;

584 • LIN – linearidade (%). É a medida do afastamento da célula espermática, considerando-se
585 a trajetória em uma linha reta. É a razão entre $VSL/VCL*100$.

586

587 2.3.2 Análise espermática por Citometria de Fluxo

588

589 A citometria de fluxo (CF) tem sido amplamente utilizada para estudar o
590 espermatozoide de mamíferos em diversas áreas, sejam elas na andrologia veterinária (para
591 avaliar o potencial de fertilidade individual), na ciência veterinária (classificando os
592 cromossomos e pré-selecionando o sexo da prole) ou até mesmo estudando e avaliando certas
593 patologias reprodutivas e as causas que podem estar interferindo naquele determinado
594 problema (CORDELLI et al., 2005).

595 Larsen et al. (2000) destacam outros aspectos que tem sido amplamente discutidos na
596 andrologia veterinária, que são as técnicas de avaliação, dedicando esforços para encontrar
597 métodos automatizados de alta precisão e sensibilidade, reduzindo a variabilidade do operador
598 e, ao mesmo tempo, visando encontrar um equipamento que tenha maior capacidade de
599 avaliar com precisão os defeitos que não são detectáveis na microscopia convencional.

600 A CF nada mais é que uma abordagem automatizada, capaz de medir a qualidade de
601 um ou mais marcadores fluorescentes, associados com a célula de uma forma imparcial, com
602 precisão, sensibilidade, rapidez e vários parâmetros, sendo analisados em um número
603 significativo de células (HOSSAIN et al., 2011).

604 Na aplicação desta técnica são inúmeras as análises realizadas. Cordelli et al. (2005)
605 destacaram algumas: contagem espermática, por meio de técnica que consiste em misturar as
606 amostras de sêmen com uma suspensão de partículas fluorescentes de concentração
607 determinada (EVENSON et al., 1993); viabilidade espermática, por meio de marcadores
608 disponíveis que podem estar agindo sozinho ou em associação com outros corantes para
609 avaliar diferentes propriedades funcionais dos espermatozoides viáveis, que podem ser
610 distinguidos pela coloração com iodeto de propídio (IP), sozinho ou em associação com o
611 marcador de ácido nucleico penetrante de membrana, o SYBR14 (RODRÍGUEZ-
612 MARTÍNEZ, 2003); motilidade espermática, que é realizada por ensaios utilizando rodamina
613 123, laranja de acridina e JC-1 para analisar o potencial de membrana mitocondrial
614 (MARCHETTI et al., 2002); reação espermática acrossomal, detectada utilizando uma
615 variedade de lecitinas fluorescentes que se ligam especificamente aos seus receptores
616 (D'CRUZ, 1996) ou aos marcadores específicos por fluorescência CD46 (CARVER-WARD,
617 1997).

618 Para avaliar a funcionalidade espermática, as alterações induzidas durante o processo
619 de capacitação são um importante fenômeno que o espermatozoide sofre antes de fertilizar o
620 oócito (HOSSAIN et al., 2011). Os estágios iniciais de capacitação espermática podem ser
621 medidos pelos espermatozoides corados com a Merocianina 540 (HARRISON e GADELLA,
622 2005). A fluorescência observada pelo CF é dependente do grau de distúrbio lipídico
623 (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 2001). A Merocianina 540 é um corante hidrófobo que,
624 quando combinada com o YO-PRO-1 e Hoechst 33342, tem a capacidade de monitorizar a
625 integridade de membrana, especialmente os arranjos de fosfolipídios (HOSSAIN, 2011).

626 Marcadores de apoptose têm sido detectados em espermatozoides de muitas espécies,
627 mas o papel destes marcadores provavelmente ainda não é completamente elucidado
628 (MORAN, 2008). Alterações na permeabilidade da membrana espermática têm sido
629 consideradas como um acontecimento típico de apoptose em diversos estudos. Por isso,
630 marcadores apoptóticos podem ser boas ferramentas para a previsão de congelabilidade e a
631 ocorrência de dano celular durante a criopreservação, embora não necessariamente a apoptose
632 realmente ocorra (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2009).

633 Hossain et al. (2011) destacaram o ensaio de TUNEL para a determinação da
634 fragmentação de DNA, sendo considerado mais eficaz do que o Anexina/PI em

635 espermatozoides de touros. O ensaio de TUNEL mede alterações na fase posterior, enquanto a
636 anexina/PI mede o início de mudanças espermáticas provocadas pela apoptose.

637 A disponibilidade de equipamentos e de marcadores versáteis para o estudo das células
638 tem permitido uma melhor avaliação dos espermatozoides, possibilitando aumentar nossa
639 capacidade de classificar espermatozoides quanto ao potencial de capacidade de fertilização.
640 Por isso, a citometria de fluxo é considerada uma metodologia reconhecida dentro da
641 espermatologia animal e deixou de ser uma ferramenta de pesquisa para tornar-se rotina na
642 avaliação de sêmen de animais destinados à reprodução (HOSSAIN et al., 2011).

643

644 **3 REFERÊNCIAS**

- 645
- 646 ABDELHAKEAM, A. A.; GRAHAM, E. F.; VAZQUEZ, I. A.; CHALONER, K. M. Studies
647 on the absence of glycerol in unfrozen ram semen: development of an extender for freezing:
648 effects of osmotic pressure, egg yolk levels, type of sugars, and the method of dilution.
649 **Cryobiology**, v. 28, n. 1, p. 43-49, 1991.
- 650 ABRAHÃO, A. A. F.; MARTINS, S. M. M. K.; VIANNA, W. L.; MORETTI, A. S. O papel
651 do diluente de semen sobre a qualidade da dose inseminante. **Revista Porkworld**, v. 23, n.
652 23, p. 30-33, 2004.
- 653 AGUIAR, P.R.L.; MORAES, J. B.; MALSCHITZKY, E.; SILVA, A. C. Criopreservação de
654 sêmen bovino utilizando diluente à base de PBS com três diferentes percentuais de gema de
655 ovo. **Veterinária em Foco**, v. 5, n. 1, p. 44-50, 2007.
- 656 AIRES, V. A.; HINSCH, K.D.; MUELLER-SCHLOESSER, F.; BOGNER, K.; MUELLER-
657 SCHLOESSER, S.; HINSCH, E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and
658 soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. **Theriogenology**, v.
659 60, p. 269–79, 2003.
- 660 AISEN, E. G.; MEDINA, V. H.; VENTURINO, A. Cryopreservation and post-thawed
661 fertility of ram semen frozen in different trehalose concentration. **Theriogenology**, v. 57, n. 7,
662 p. 1801-1808, 2002.
- 663 AITKEN, R. J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility**
664 **and Development**, v. 7, p. 659- 68, 1995.
- 665 AKHTER, S.; ANSARI, M. S.; ANDRABI, S. M. H.; RAKHA, B. A.; ULLAH, N. ;
666 KHALID, M. Soya-lecithin in Extender Improves the Freezability and Fertility of Buffalo
667 (*Bubalus bubalis*) Bull Spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 815–819,
668 2012.
- 669 ALVAREZ, M.; TAMAYO-CANUL, J.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, C.; LÓPEZ-URUEÑA,
670 E.; GOMES-ALVES, S.; ANEL, L.; MARTINEZ-PASTOR, F.; DE PAZ, P. Specificity of
671 the extender used for freezing **ram** sperm depends of the spermatozoa source (ejaculate,
672 electroejaculate or epididymis), **Animal Reproduction Science**, v. 132, p. 145–154, 2012.

- 673 ALVAREZ, M.; TAMAYO-CANUL, J.; ANEL, E.; BOIXO, J. C.; MATA-CAMPUZANO,
674 M.; MARTINEZ-PASTOR, F.; ANEL, L.; DE PAZ, P. Sperm concentration at freezing
675 affects post-thaw quality and fertility of ram sêmen. **Theriogenology**, v. 77, p. 1111–1118,
676 2012.
- 677 ALVES, S.G.G.; RIBEIRO FILHO, A.L.; SNOECK, P.P. N.; BITTENCOURT, R. F.;
678 PORTELA, A. P. M.; ALMEIDA, A. K.; MELO, M. I. V.; HENRY, M. Efeito da solução, da
679 fixação em formol-salina e do tempo de incubação sobre os resultados do teste hiposmótico
680 para sêmen equino congelado. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 219-225, 2005.
- 681 AMANN, R. P.; KATZ, D. F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v.
682 25, p. 317-325, 2004.
- 683 ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H. F.;
684 OLIVEIRA, L. Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; LEMES, K. M.;
685 JAIMES, D. J. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e
686 desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, p. 145-151, 2011.
- 687 AURICH, J. E.; SCHÖNHERR, U.; HOPPE, H.; AURICH, C. Effects of antioxidants on
688 motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogenology**, v. 48, p.
689 185-192, 1997.
- 690 BAILEY, J.L.; BUHR, M.M. The impact of cryopreservation on Ca²⁺ regulation by bovine
691 spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 45-52, 1994.
- 692 BEZERRA, F. S. B. Conservação do sêmen caprino sob refrigeração ou congelação. **Acta**
693 **Veterinaria Brasilica**, v. 4, Supl., p. S20-S25, 2010.
- 694 BERGSTEIN, T. G.; WEISS, R. R.; BICUDO, S. D. Técnicas de análise de sêmen. **Revista**
695 **Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 4, p. 189-194, 2014.
- 696 BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO FILHO, A. L.; LIMA, M. C. C.; ALVES, S. G. G.;
697 VASCONCELOS, M. F.; BISCADÉ, C. E.; LEAL, L. S. OBA, E. O efeito de um quelante de
698 cálcio, de um detergente e da lecitina de soja sobre a congelabilidade do sêmen caprino.
699 **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, p. 305-312, 2008.

- 700 BITTENCOURT, R. F.; OBA, E.; FILHO, A. L. R.; CHALHOUB, M.; AZEVEDO, H. C.;
- 701 BICUDO, S. D. Avanços na criopreservação do sêmen ovino I: diluidores e crioprotetores.
- 702 **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 4, 2013.
- 703 BOSSEAU, B.; BILLARD, J. P.; MARGUANT-LE, B.; GUÉRIN, B.; CAMUS, A.;
- 704 LECHAT, M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk source and the in
- 705 vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based
- 706 diluents. **Theriogenology**, v. 50, p. 699-706, 1998.
- 707 CÂMARA, D. R.; GUERRA, M. M. P. Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino:
- 708 danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a
- 709 qualidade espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 1, p. 33-40,
- 710 2011.
- 711 CANDAN, N.; TUZMEN, N. Very rapid quantification of malondialdehyde (MDA) in rat
- 712 brain exposed to lead, aluminium and phenolic antioxidants by high-performance liquid
- 713 chromatography-fluorescence detection. **NeuroToxicology**, v. 29, p. 708-713, 2008.
- 714 CARVER-WARD, J. A.; MORAN-VERBEEK, I. M.; HOLLANDERS, J. M. Comparative
- 715 flow cytometric analysis of the human sperm acrosome reaction using CD46 antibody and
- 716 lectins. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 14, p. 111–119, 1997.
- 717 CASTELO, T. Z.; FROTA, T. R.; SILVA, A. R. Considerações sobre a criopreservação do
- 718 sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 2, n. 3, p. 67-75, 2008.
- 719 CHOE, C.Y.; KIM, J. G.; CHO, S. R.; SON, D. S.; KIM, Y, K.; BALASUBRAMANIAN, S.;
- 720 CHOE, S. Y.; RHO, G. J. Influence of seasons, extenders, slow and rapid freezing on seminal
- 721 characters in Korean native bucks. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 41, p. 55-60, 2006.
- 722 CRESPILO, A. M.; SÁ FILHO, M. F.; DELL'AQUA JR, J. A.; NICHI, M.; MONTEIRO,
- 723 G. A.; AVANZI, B. R.; MARTINS, A.; PAPA, F. O. Comparison of *in vitro* and *in vivo*
- 724 fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or new lecithin based extenders.
- 725 **Livestock Science**, v. 149, p. 1-6, 2012.
- 726 CORDELLI, E.; ELEUTERI, P.; LETER, G.; RESCIA, M. ; SPANÒ, M. Flow cytometry
- 727 applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA
- 728 integrity. **Contraception**, v. 72, p. 273– 279, 2005.

- 729 COX, J. F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Computer-
730 assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in
731 cervical mucus. **Theriogenology**, v. 66, p. 860-867, 2006.
- 732 D'CRUZ, O. J.; HAAS, G. G. Fluorescence-labeled fucoselectins are superior markers for flow
733 cytometric quantitation of the human sperm acrosome reaction. **Fertility and Sterility**, v. 65,
734 p. 843– 51, 1996.
- 735 DALMAZZO, A. Utilização da lecitina de soja para refrigeração e criopreservação do sêmen
736 de cães. 2012. 103f. **Dissertação (Mestrado em Ciências)**. Universidade de São Paulo.
737 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal. São
738 Paulo, SP, Nov. 2012.
- 739 DE LEEUW, F. E. **et al.** Effects of various cryoprotective agents and membrane stabilizing
740 compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. **Cryobiology**, v. 3,
741 p. 32-44, 1993.
- 742 DEL VALLE, I.; GÓMEZ-DURÁN, A.; HOLT, W. V.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-
743 PÉREZ, J. A. Soy lecithin interferes with mitochondrial function in frozen-thawed ram
744 spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 33, p. 717–725, 2012.
- 745 DORADO, J.; RODRÍGUEZ, I.; HIDALGO, M. Cryopreservation of goat spermatozoa:
746 comparison of two based extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after
747 artificial insemination. **Theriogenology**, v. 68, p. 168-177, 2007a.
- 748 EMAMVERDI, M.; ZHANDI, M.; ZARE SHAHNEH, A.; SHARAFI, M.; AKBARI-
749 SHARIF, A. Optimization of Ram Semen Cryopreservation Using a Chemically Defined
750 Soybean Lecithin-Based Extender. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, p. 899-904,
751 2013.
- 752 ENGLAND, G. C. W. Cryopreservation of dog semen: a review. **Journal of Reproduction**
753 **and Fertility**, Supl, v. 47, p. 243-255, 1993.
- 754 EVENSON, D. P.; PARKS, J. E.; KAPROTH, M. T.; JOST, L. K. Rapid determination of
755 sperm cell concentration in bovine semen by flow cytometry. **Journal Dairy Science**, v. 76,
756 p. 86–94, 1993.

- 757 FARSTAD, W. Cryopreservation of canine semen - New challenges. **Reproduction in**
758 **Domestic Animals**, v. 44, p. 336-341, 2009.
- 759 FOROUZANFAR, M.; SHARAFI, M.; HOSSEINI, S. M.; OSTADHOSSEINI, S.; HAJIAN,
760 M.; HOSSEINI, L.; ABEDI, P.; NILI, N.; RAHMANI, H. R.; NASR-ESFAHANI, M. H. In
761 vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for
762 cryopreservation of ram semen. **Theriogenology**, v. 73, p. 480-487, 2010.
- 763 FUTINO, D. O. Uso de glicerol, metil-formamida e dimetil-formamida como crioprotetores
764 do sêmen canino. 2008. 73f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Animais)**, Universidade de
765 Brasília.
- 766 GARNER, D. L. Ancillary tests of bull semen quality. **Veterinary Clinics of North**
767 **America**, v. 13, p. 313-327, 1997.
- 768 GIL, J.; RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M.; LUNDEHEIM, N.; SÖDERQUIST,
769 L.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell[®] and used for
770 cervical artificial insemination. **Theriogenology**, v. 59, n. 5-6, p. 1157-1170, 2003a.
- 771 GIL, J.; LUNDEHEIM, N.; SÖDERQUIST, L.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Influence of
772 extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen.
773 **Theriogenology**, v. 59, n. 5-6, p. 1241-1255, 2003b.
- 774 GUERRA, M. M. P.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Papel de oxidantes e antioxidantes
775 na andrologia (Revisão de literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, p.
776 187-195, 2004.
- 777 GUIMARÃES, A. A. Avaliação de diferentes diluentes na criopreservação de sêmen ovino
778 (*Ovis aries*). 2010. 76f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Animais)**, Universidade do
779 Pará.
- 780 HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian
781 sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, n. 1, p. 73-88, 1990.
- 782 HARRISON, R.; GADELLA, B. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm
783 capacitation. **Theriogenology**, v. 63, p. 342-51, 2005.

- 784 HIGASHIYAMA, T. Novel functions and applications of trehalose. **Pure and Applied**
785 **Chemistry**, v. 74, n. 7, p. 1263–1269, 2002.
- 786 HOLT, W. V. Basic aspects on frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.
787 62, p. 3-22, 2000a.
- 788 HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and
789 individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000b.
- 790 HOSSAIN, S.; JOHANNISSON, A. ;WALLGREN, M.; NAGY, S.; SIQUEIRA, A. P.;
791 RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity
792 and functionality: state of the art. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, p. 406–419 2011.
- 793 JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. Semen collection, evaluation,
794 and preservation. In: JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. (Ed.)
795 **Canine and feline theriogenology**. 1 ed. Philadelphia: Saunders, p.287-306, 2001.
- 796 KHALIFA, T.; LYMBEROPOULOS, A.; THEODOSIADOU, E. Association of soybean-
797 based extender with field fertility of stored ram (*Ovis aries*) semen: A randomized double-
798 blind parallel group design. **Theriogenology**, v. 79, n. 3, p. 517-527, 2013.
- 799 LARSEN, L.; SCHEIKE, T.; JENSEN, T. K.; BONDE, J.P.; ERNST, E.; HJOLLUND, N. H.
800 The Danish First Pregnancy Planner Study Team. Computer-assisted semen analysis
801 parameters as predictors for fertility of men from the general population. **Human**
802 **Reproduction**, v. 15, p. 1562 – 1567, 2000.
- 803 LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for
804 artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 113-141, 2000.
- 805 LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. **Reproductive Biology**, v. 5,
806 p. 5-17, 2005.
- 807 MALMGREN, L. Assessing the quality of raw semen: a review. **Theriogenology**, v. 48, p.
808 523-530, 1997.
- 809 MARCHETTI, C.; OBERT, G.; DEFFOZEZ, A.; MARCHETTI, P. Study of mitochondrial
810 membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow
811 cytometry in human sperm. **Human Reproduction**, v. 17, p. 1257– 65, 2002.

- 812 MARTI, J. I.; MARTÍ, E.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Survival rate of
813 antioxidant enzyme activity of ram spermatozoa after dilution with different extenders or
814 selection by a dextran swin-up procedure. **Theriogenology**, v. 60, p. 1025-1037, 2003.
- 815 MATA-CAMPUZANO, M.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; TAMAYO-CANUL,
816 J.; LÓPEZ-URUEÑA, E.; DE PAZ, P.; ANEL, L.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; ÁLVAREZ,
817 M. Refrigerated storage of ram sperm in presence of Trolox and GSH antioxidants: Effect of
818 temperature, extender and storage time. **Animal Reproduction Science**, v. 151, p. 137-147,
819 2014.
- 820 MALMGREN L. Assessing the quality of raw semen: a review. **Theriogenology**, v. 48, p.
821 523-530, 1997.
- 822 MAXWELL, W. M.; STOJANOV. T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence
823 of some antioxidants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, n. 6, p. 1013-1020,
824 1996.
- 825 McPHAIL, D. B.; GOODMAN, B. A. Tris-buffer – a case for caution in its use for cooper
826 containing systems. **Biochemical Journal**, v. 221, p. 559-560, 1984.
- 827 MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L. Current
828 status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, p. 327-344,
829 2002.
- 830 MELO, C. M. Ação dos crioprotetores na biotecnologia de sêmen congelado. 2003. 19f.
831 **Seminário (Disciplina de Seminários I do curso de Mestrado)**. Universidade Estadual
832 Paulista (UNESP).
- 833 MELO, C. C. S. Conservação de sêmen caprino a 4°C utilizando ACP-101[®] com duas
834 concentrações de *Aloe vera* ou gema de ovo. 2010. 72f. **Dissertação (Mestrado em Ciências
835 Veterinárias)**. Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza, CE, Jul. 2010.
- 836 MICHAEL, A.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E. **et al.** Effect of antioxidant
837 supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine
838 spermatozoa. **Theriogenology**, v. 68, n. 2, p. 204-212, 2007.

- 839 MOLINIA, F. C.; EVANS, G.; QUINTANACASARES, P.; MAXWELL, W. M. C. Effect of
840 monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluents on motility, acrosome integrity and
841 fertility of pellet frozen ram spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 36, n. 1-2, p.
842 113-122, 1994.
- 843 MORAN, J.; MADEJOÑ, L.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; PEÑA, F. Nitric oxide induces
844 caspase activity in boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 70, p. 91–96, 2008.
- 845 MORTIMER, S. T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm
846 movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v. 3, p. 403-439, 1997.
- 847 MORTIMER, S. T.; MAXWEL, W. M. C. Kinematic definition of ram sperm
848 hyperactivation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 11, p. 25-30, 1999.
- 849 MORTIMER, S. T. CASA-practical aspects. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 515-524, 2000.
- 850 MORTIMER, S. T. The future of computer-aided sperm analysis. **Asian Journal of**
851 **Andrology**, v. 17, p. 545-553, 2015.
- 852 MURGAS, L.D.S.; ZANGERÔNIMO, M.G.; SANTOS, A.G.O. et al. Oxitocina no sêmen
853 suíno heterospérmico resfriado a 15°C. **Ciência Animal Brasileira**, v. 3, n. 2, p. 33-40, 2002.
- 854 NAING, S. W.; WAHID, H.; MOHD AZAM, K.; ROSNINA, Y.; ZUKI, A. B.; KAZHAL,
855 S.; BUKAR, M. M.; THEIN, M.; KYAW, T.; SAN, M. M. Effect of sugars on characteristics
856 of Boer goat semen after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 122, p. 23-28,
857 2010.
- 858 NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C.; ALONSO, M. A.;
859 CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P. Effects of sperm concentration and straw volume on
860 motion characteristics and plasma, acrosomal, and mitochondrial membranes of equine
861 cryopreserved spermatozoa. **Journal Equine Veterinary of Science**, v. 28, p. 351– 8, 2008.
- 862 OLIVEIRA, J.V. Congelação de sêmen de eqüídeos e seu uso: limitações e perspectivas.
863 2002. 21f. **Monografia (Disciplina de Seminários I, do Programa de Pós-Graduação em**
864 **Medicina Veterinária)** Universidade Estadual Paulista.

- 865 ORTEGA, A. M.; IZQUIERDO, A. C.; GÓMEZ, J. J. H.; OLIVARES-CORICHI, I. M.;
866 TORRES, V. M. M.; MÉNDEZ, J. J. V. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la
867 preservación de semen (Artigo de Revisão). **Interciencia**, v. 28, n. 12, p. 699-704, 2003.
- 868 ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GARCÍA, B.; GALLARDO-BOLANÓS, J.; GONZÁLEZ-
869 FERNÁNDEZ, L.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Apoptotic markers can be used to forecast
870 the freezeability of stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 114, p. 393-403,
871 2009.
- 872 PARTYKA, A.; LUKASZEWICZ, E.; NIŻAŃSKI, W.; TWARDOŃ, J. Detection of lipid
873 peroxidation in frozen-thawed avian spermatozoa using C(11)-BODIPY(581/591).
874 **Theriogenology**, v. 75, n. 9, p. 1623-1629, 2011.
- 875 PAZ, P.; ESTESO, M. C.; ALVAREZ, M.; MATA, M.; CHAMORRO, C. A.; ANEL, L.
876 Development of extender based on soybean lecithin for its application in liquid ram semen.
877 **Theriogenology**, v. 74 p. 663-671, 2010.
- 878 PEÑA, A.; LINDE-FORSBERG, C.B. Effects of spermatozoal concentration and post-thaw
879 dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v. 54, p. 703-18,
880 2000.
- 881 PEREZ, E. G. A; VIANA, C. H. C.; SILVA, R. O. C.; DALMAZZO, A.; GÓES, P. A. A.;
882 GURGEL, J. R. C.; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C. Efeito da adição de glutathione na
883 função e estresse oxidativo em sêmen ovino criopreservado. **Brazilian Journal of**
884 **Veterinary Research and Animal Science**, v. 49, n. 4, p. 262-268, 2012.
- 885 PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63,
886 p. 215-225, 2006.
- 887 QUINN, P.; CHOW, P.; WHITE, I. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa
888 from cold shock at a plasma membrane site. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 60, p.
889 403-407, 1980.
- 890 RAIJMAKERS, M. T.; ROELOFS, H. M.; STEEGERS, E. A.; STEEGERS-THEUNISSEN,
891 R. RÉ.; MULDER, T. P.; KNAPEN, M.F.; WONG, W. Y.; PETERS, W. H. Glutathione and
892 glutathione s-transferases A1-1 and P1-1 in seminal plasma may play a role in protecting
893 against oxidative damage to spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 79, p. 169-172, 2003.

- 894 REKHA, A.; ZOHARA, B. F.; BARI, F. Y.; ALAM, MD. G. S. Comparison of commercial
895 Triladyl extender with a tris-fructose-egg-yolk extender on the quality of frozen semen and
896 pregnancy rate after transcervical AI in Bangladeshi indigenous sheep (*Ovis aries*). **Small**
897 **Ruminant Research**, v. 134, p. 39–43, 2016.
- 898 RIGAU, T.; RIVERA, M.; PALOMO, M. J.; FERNÁNDEZ-NOVELL, J. M.; MOGAS,
899 T.; BALLESTER, J.; PEÑA, A.; OTAEGUI, P. J.; GUINOVART, J. J.; RODRÍGUEZ-GIL,
900 J. E. Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa.
901 **Reproduction**, v. 123, p. 579-591, 2002.
- 902 ROBERTSON, L.; BAILEY, J.L.; BUHR, M.M. Effects of cold shock and phospholipase A₂
903 on intact boar spermatozoa and sperm head plasma membranes. **Molecular, Reproduction**
904 **and Development**, v. 26, p. 143-149, 1990.
- 905 RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still
906 utopia? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, p. 312–8, 2003.
- 907 ROTA, A.; IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J.; LINDE-FORSBERG, C. Fertility after
908 vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a TRIS extender with or without Equex
909 STM Paste. **Theriogenology**, v. 51, n. 6, p. 1045-58, 1999.
- 910 SANTOS, D.O. Estudo do perfil protéico nas membranas de espermatozóides congelados de
911 caprinos. 2005. 62 f. **Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)** Universidade Estadual
912 Paulista.
- 913 SALMANI, H; NABI, M. M.; VASEGHI-DODARAN, H.; RAHMAN, M. B.;
914 MOHAMMADI-SANGCHESHMEH, A.; SHAKERI, M.; TOWHIDI, A.; SHAHNEH, A. Z.;
915 ZHANDI, M. Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen
916 quality after freezing-thawing. **Small Ruminant Research**, v. 112, p. 123-127, 2013.
- 917 SALAMON, S.; VISSER, D. Effect of composition of Tris-based diluents and thawing
918 solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. **Australian Journal of**
919 **Biological Sciences**, v. 25, p. 605, 1972.
- 920 SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction**
921 **Science**, v. 62, p. 77-111, 2000.

- 922 SCHMITT, F. L. A concentração, a composição e a qualidade do plasma seminal na
923 preservação do sêmen equino a +4°C. 2002. 101f. **Dissertação (Mestrado em Medicina**
924 **Veterinária)**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 925 SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e
926 alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35,
927 n. 4, p. 370-384, 2011.
- 928 SILVA, S. V.; SOARES, A. T.; BATISTA, A. M.; ALMEIDA, F. C.; NUNES, J.
929 F.; PEIXOTO, C. A.; GUERRA, M. M. In vitro and in vivo evaluation of ram sperm frozen in
930 Tris egg-yolk and supplemented with superoxide dismutase and reduced glutathione.
931 **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 874–881, 2011.
- 932 SILVA, S. V.; SOARES, A. T.; BATISTA, A. M.; ALMEIDA, F. C.; NUNES, J.
933 F.; PEIXOTO, C. A.; GUERRA, M. M. Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk
934 extender preserves ram spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation.
935 **Animal Reproduction Science**, v. 137, p. 37-44, 2013.
- 936 SALVIANO, M. B.; SOUZA, J. A. T. Avaliação andrológica e tecnologia do sêmen caprino.
937 **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 3, p. 159-167, 2008.
- 938 SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants.
939 **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1315-1321, 1995.
- 940 SMITH, A. H.; POLGE, C. Survival of spermatozoa at low temperatures. **Nature**, v. 166, p.
941 668-671, 1950.
- 942 SOUSA, D. B. Viabilidade do sistema Equitainer® na refrigeração do sêmen ovino avaliado
943 pelas análises computadorizada, de microscopia epifluorescente e inseminação artificial.
944 2002. **Dissertação (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia)**, Universidade
945 Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2002.
- 946 SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; VANDERWALL, D. K.; Mc CUE, P. M.; BRUEMMER,
947 J. **Cooled and frozen stallion semen**. Fort Collins: Colorado State University. 1999. 80p.
948 (Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Bulletin. N.9).

- 949 TEKIN, N.; UYSAL, O.; AKÇAY, E.; YAVAS, I. Effects of different taurine doses and
950 freezing rate on freezing of ram semen. **Ankara Universitesi Veteriner Fakültesi Derg**, v.
951 53, p. 179–184, 2006.
- 952 VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in
953 andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002.
- 954 VIDAL, A. H.; BATISTA, A. M.; SILVA, E. C. B.; GOMES, W. A.; PELINCA, M. A.;
955 SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat
956 sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 109, p. 47-51, 2013.
- 957 WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa
958 and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and**
959 **Development**, v. 7, p. 871-891, 1995.
- 960 WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal**
961 **Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.
- 962 WHITE, I.G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a
963 review. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, p. 639-658, 1993.
- 964 YAMASHIRO H, et al. Trehalose enhanced the freezability of Poodle dog sperm collected by
965 an artificial vagina (AV). **Animal Reproduction Science**, v. 102, p. 165-171, 2007.
- 966 YÁÑIZ, J. L.; MARCO-AGUADO, M. A.; MATEOS, J. A.; SANTOLARIA, P. Bacterial
967 contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effect on sperm quality during
968 storage at 15 °C. **Animal Reproduction Science**, v. 122, p. 142-149, 2010.
- 969 YÁÑIZ, J. L.; MATEOS, J. A.; SANTOLARIA, P. Zwitterionic buffers preserve ram semen
970 quality more efficiently than TRIS during storage at 15 °C. **Small Ruminant Research**, v. 95,
971 p. 54-60, 2011.
- 972 YILDIZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M.; TEKELI, T. Influence of sugar supplementation of the
973 extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing.
974 **Theriogenology**, v. 54, n. 4, p. 579-585, 2000.
- 975 YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. **Animal**
976 **Reproduction Science**, v. 60-61, p. 349-355, 2000.

977 ZHAO, B. T.; HAN, D.; XU, C. L.; LUO, M. J.; CHANG, Z. L.; TAN, J. H. Protocol
978 optimization for long-term liquid storage of goat semen in a chemically defined extender.
979 **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 865-872, 2009.

980

981 **ARTIGO: Uso da lecitina de soja em substituição à gema de ovo no**
982 **diluidor de congelação de espermatozoides ovinos**

983 *Use of soybean lecithin in extender to replace egg yolk on ram sperm freezing*

984

985 Wilton Arruda Gomes, Robespierre Augusto Joaquim Araújo Silva, Lúcia Cristina Pereira
986 Arruda, Helder Melo de Souza, Millena Maria Monteiro, André Mariano Batista, Maria
987 Madalena Pessoa Guerra*.

988

989 *Laboratório de Andrologia (ANDROLAB), Departamento de Medicina Veterinária,*
990 *Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n.*
991 *Dois Irmãos, Recife, PE. CEP: 52171-900, Brasil.*

992

993

994

995

996

997

998

999 ***Autor para correspondência:** Maria Madalena Pessoa Guerra, Departamento de
1000 Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de
1001 Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife, Pernambuco, Brazil. Tel.: +55 81
1002 3320 6414; fax: +55 81 3320 6057. E-mail: mmpguerra@gmail.com
1003 /mmpguerra@pq.cnpq.br

1004

1005 **RESUMO**

1006 O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de diferentes concentrações de lecitina de soja,
1007 adicionadas ao diluidor Tris para criopreservação de sêmen ovino, sobre a cinética e a
1008 integridade das membranas plasmática e acrossomal. Após colheita, cada *pool* de sêmen foi
1009 dividido em quatro partes, as quais foram diluídas em Tris-Gema de ovo (TG) ou Tris-
1010 Lecitina de Soja nas concentrações de 1% (LS1), 2% (LS2) e 3% (LS3). A seguir, as amostras
1011 foram envasadas em palhetas (0,25 mL; 200×10^6 sptz/mL), identificadas, submetidas à
1012 criopreservação e armazenadas em botijão criobiológico até análise. Após descongelação
1013 (“37 °C/30”), as amostras foram submetidas à análise de cinética espermática no sistema
1014 computadorizado de análise espermática (CASA) e avaliação da integridade das membranas
1015 plasmática e acrossomal (iMPA) por citometria de fluxo. Maiores porcentagens de motilidade
1016 (total e progressiva) foram observadas no grupo TG quando comparadas aos grupos LS. As
1017 análises da cinética revelaram que as variáveis espermáticas de linearidade (LIN),
1018 retilinearidade (STR) e WOB foram menores nos grupos diluídos em LS, do que no TG. Os
1019 resultados de velocidade curvilinear (VCL) e amplitude de deslocamento lateral de cabeça
1020 (ALH) foram maiores nos grupos LS quando comparados ao grupo TG, mas não houve
1021 diferença entre os grupos LS. O grupo TG não diferiu dos grupos LS, nas diferentes
1022 concentrações, para as variáveis de velocidade progressiva (VSL), velocidade média do
1023 trajeto (VAP) e frequência de batimentos do flagelo (BCF). Em conclusão, pode-se inferir que
1024 o diluidor contendo lecitina de soja 1% confere proteção às membranas plasmática e
1025 acrossomal do sêmen congelado-descongelado de carneiros.

1026 **Palavras-chave:** acrossoma, carneiro, cinética espermática, citometria de fluxo

1027

1028 **ABSTRACT**

1029 The aim of this study was evaluate the effects of different soybean lecithin concentrations
1030 added to Tris extender for ram semen cryopreservation on the kinetics and the integrity of
1031 plasma and acrossomal membranes. Following collection, each pool semen was divided into
1032 four groups, diluted in Tris-egg yolk (EY) or Tris-soybean lecithin at concentrations 1%
1033 (SL1), 2% (SL2) and 3% (SL3). Then, samples were packaged in identified straws of 0.25 ml
1034 (200×10^6 sperm/mL), cryopreserved and stored (-196 °C) until analysis. After thawing, the
1035 samples were subjected to kinetic sperm analysis in the sperm computerized analysis (CASA)
1036 and evaluation of the integrity of the plasma membrane (IPM) and acrosomal membrane
1037 (IAC) by flow cytometry. Superior percentage motility (total and progressive) was observed
1038 in the TG group, which were higher ($p < 0.05$) than the SL groups. Linearity (LIN),
1039 straightness (STR) and WOB were lower ($p < 0.05$) in SL groups than EY. Curvilinear velocity
1040 (VCL) and amplitude of lateral displacement head (ALH) were higher ($p < 0.05$) in the SL
1041 groups when compared to the EY group, but there was no difference among the SL groups.
1042 The EY group did not differ ($p > 0.05$) of the SL groups for progressive velocity (VSL), path
1043 velocity (VAP) and beat cross frequency (BCF). In conclusion, the extender composed of
1044 soybean lecithin at 1% provides protection to the plasma and acrosome membranes of frozen-
1045 thawed ram semen.

1046 **Keywords:** acrossome, flow cytometry, ram, sperm kinetics

1047

1048 1. INTRODUÇÃO

1049 A Inseminação Artificial (IA) mudou a indústria dos pequenos ruminantes, por
1050 permitir o melhoramento genético, controle de doenças sexualmente transmissíveis,
1051 disseminação de genética valiosa e preservação de genética de raças ameaçadas de extinção
1052 (Cseh *et al.*, 2012).

1053 Diluidores à base de gema de ovo são conhecidos por preservar espermatozoides
1054 ovinos contra as crioinjúrias ocorridas durante os processos de congelação-descongelação
1055 (Salamon e Maxwell, 2000; Paulenz *et al.*, 2002). Apesar disso, a grande variabilidade na
1056 composição da gema de ovo, que dificulta a padronização na preparação dos diluidores, e o
1057 risco de contaminação microbiana, que pode levar à produção de endotoxinas, reduzindo a
1058 capacidade fertilizante dos espermatozoides e aumentando o risco de transmissão de doenças,
1059 tem impulsionado a procura por um substituto à gema de ovo que atenda às necessidades da
1060 célula espermática durante o processo de criopreservação (Aires *et al.*, 2003; Gil *et al.*, 2003;
1061 Zhao *et al.*, 2009).

1062 A lecitina de soja (LS) tem sido utilizada com sucesso para suplementar meios de
1063 criopreservação de sêmen em várias espécies, tais como bovina (Aires *et al.*, 2003; Crespilho
1064 *et al.*, 2012), equina (Papa *et al.*, 2011), ovina (Paz *et al.*, 2010) e caprina (Vidal *et al.*, 2013).
1065 Entretanto, os resultados são variáveis entre os estudos e seus efeitos sobre as propriedades
1066 funcionais dos espermatozoides precisam ser conhecidos.

1067 Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de
1068 lecitina de soja, adicionadas ao diluidor Tris para criopreservação de sêmen ovino, sobre as
1069 variáveis de cinética espermática e integridade das membranas plasmática e acrossomal.

1070

1071

1072 2. MATERIAL E MÉTODOS

1073 *Reagentes*

1074 Exceto os especificados, todos os reagentes utilizados neste estudo foram adquiridos
1075 da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). A Lecitina de soja utilizada apresenta as seguintes
1076 características: P5638 (L- α -Phosphatidylcholine, Tipo II-S, 14-23% Choline).

1077

1078 *Animais, colheita e avaliação do sêmen fresco*

1079 Todos os procedimentos envolvendo animais foram realizados após aprovação pela
1080 Comissão de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco, sob
1081 licença nº 046/2015 CEUA/UFRPE.

1082 Quatro machos ovinos da raça Santa Inês (dois anos de idade) e com histórico de
1083 fertilidade foram utilizados. Os animais foram mantidos, durante todo o período experimental,
1084 em regime intensivo, alimentados com feno de tifton e ração comercial concentrada
1085 (400g/dia), além de sal mineral e água *ad libitum*.

1086 O sêmen foi colhido duas vezes por semana durante quatro semanas, pelo método de
1087 vagina artificial utilizando uma fêmea como manequim. Após colheita, as amostras de sêmen
1088 foram avaliadas subjetivamente, por meio de microscopia óptica de contraste de fase
1089 (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) quanto ao movimento de massa e motilidade
1090 espermática. Cada ejaculado foi avaliado separadamente e após aprovado (turbilhonamento \geq
1091 3 e motilidade \geq 70%, (CBRA, 2013) foi realizada a formação do *pool* (n = 8) dos ejaculados.

1092 A concentração espermática do *pool* foi obtida usando a Câmara de Neubauer e as
1093 patologias espermáticas foram avaliadas por meio da técnica de câmara úmida (Mies Filho,
1094 1987). Apenas *pools* de ejaculados que apresentaram concentração espermática $\geq 1 \times 10^9$
1095 espermatozoides/mL e patologia espermática $\leq 20\%$ foram destinados à criopreservação.

1096 *Preparação dos diluidores*

1097 O tampão Tris (375 mM Tris, 124 mM Ácido Cítrico, 41,6 mM Frutose) foi utilizado
1098 para preparação dos diluidores. O diluidor à base de gema de ovo (Tris + 20% de gema de
1099 ovo) foi utilizado como grupo controle (TG). Os grupos tratamentos consistiram da adição de
1100 1%, 2% ou 3% (p/v) de Lecitina de Soja (LS), ao tampão Tris, constituindo, respectivamente,
1101 os grupos LS1, LS2 e LS3. Em todos os diluidores, a concentração final de glicerol foi 5%.

1102 Após a adição da LS ao Tris, os diluentes foram mantidos em hidratação por 1 hora à
1103 temperatura ambiente (25 °C). Em seguida, as suspensões foram homogeneizadas em
1104 misturador magnético até a formação de uma solução homogênea. Posteriormente, as
1105 soluções foram clarificadas e os debris celulares foram removidos por centrifugação (2200 g/
1106 30 min), seguido por dupla filtração; inicialmente em filtro 3 µm (Cellulose Ester Filter,
1107 SSWP04700, Merck-Millipore, USA) e em sequência a 0,45 µm (Chromafil® Xtra PVDF-
1108 45/25, Marcherey-Nagel GmbH & Co., Germany). Após finalizado este processo, foram
1109 adicionados 100 UI de Penicilina e 50 mg de Estreptomicina; a osmolaridade e o pH foram
1110 ajustados para 340 mOsm/Kg e 6,8, respectivamente.

1111

1112 *Criopreservação*

1113 Cada *pool* de ejaculado foi dividido em quatro partes, as quais foram diluídas em TG
1114 (controle), LS1, LS2 e LS3 para concentração final de 200×10^6 espermatozoides/mL,
1115 envasadas em palhetas identificadas (0,25 mL) e submetidas à criopreservação em sistema
1116 automatizado (TK 3000, TK tecnologia em Congelação Ltda, Uberaba, Brasil), utilizando
1117 curva de congelação de -0,25 °C/min até atingir 5 °C; seguida por período de estabilização a
1118 5 °C por 2 h, e finalmente congeladas com taxa de -15 °C/min até -120 °C. Imediatamente
1119 após congelação, as palhetas foram transferidas para o nitrogênio líquido (-196 °C) e
1120 armazenadas em botijão criobiológico.

1121 *Descongelamento e avaliação do sêmen criopreservado*

1122 Para cada grupo experimental, duas palhetas foram descongeladas (37 °C por 30
1123 segundos) e agrupadas. Para realizar as análises, alíquotas (10 µL) de cada grupo foram
1124 diluídas no diluidor utilizado para congelamento, sem glicerol, de forma a atingir a concentração
1125 final de 50×10^6 espermatozoides/mL. Então, as amostras foram submetidas à análise da
1126 cinética espermática, usando o sistema computadorizado de análise espermática (CASA), e
1127 avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal (iMPA), por meio de
1128 citometria de fluxo.

1129

1130 *Cinética espermática*

1131 A avaliação da cinética espermática foi realizada utilizando-se o sistema CASA
1132 (SCATM; Microptics, S.L., Version 5.1, Barcelona, Spain). Uma alíquota (2,5 µL) de cada
1133 amostra foi colocada sobre lâmina, coberta por lamínula, pré-aquecidas a 37 °C, avaliada por
1134 microscopia de contraste de fase (Eclipse 50i, Nikon, Japan) e as imagens foram captadas por
1135 uma câmara de vídeo (Basler Vision Technologies, A312FC, Ahrensburg, Germany). As
1136 avaliações de motilidade espermática foram realizadas em cinco campos aleatórios e não
1137 consecutivos para cada amostra, pelo mesmo operador utilizando os seguintes *settings*:
1138 temperatura de 37 °C; magnificação, 100 x; número de quadros, 25; imagens por segundo, 25;
1139 área de cabeça, 20 a 70 µm²; VAP: lentos 10 µm/s < médios 45 µm/s < rápidos 75 µm/s;
1140 progressividade, 80% STR; circular, 50% LIN.

1141

1142 *Integridade das membranas plasmática e acrossomal*

1143 Para análise da integridade das membranas plasmática e acrossomal os seguintes
1144 procedimentos foram realizados: uma alíquota de 40 µL de sêmen, de cada grupo
1145 experimental, foi diluída em 1 mL de PBS (Fosfato Salino Tamponado, Dulbecco's, livre de

1146 Ca^{+2} e Mg^{+2}) e centrifugada (600 g/10 min) para remoção do diluidor e debris celulares. Em
1147 seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspense em 40 μL de PBS.
1148 Posteriormente, as amostras foram coradas com 1,0 μL de FITC-conjugada ao *Peanut*
1149 *agglutinin* (FITC-PNA; 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, em PBS) e 2,0 μL de iodeto de propídio (IP; 0,5 mg/mL
1150 em PBS), incubadas por 10 min a temperatura ambiente e avaliadas.

1151 A avaliação foi realizada utilizando o citômetro de fluxo Amnis ImageStream Mark II
1152 (EMD Millipore Corp.), equipado com microscópio com objetiva de 60x, com uma taxa de
1153 imagem de 5000 células/seg. O tamanho das células e a velocidade do fluxo foi de 7,0 μm e
1154 44 mm/segundo, respectivamente. As amostras foram analisadas utilizando-se um laser de
1155 488 nm com intensidade definida para 55.0 mV. Aproximadamente 5000 eventos foram
1156 coletados por amostra. A aquisição das imagens brutas foi obtida usando o software
1157 INSPIRE[®]. As imagens do campo claro foram coletadas no canal 1 após iluminação com luz
1158 branca, o FITC-PNA foi coletado no canal 2 (505-560 nm) e o IP no canal 5 (640-745 nm).
1159 As análises das imagens brutas foram realizadas usando o software IDEAS[®] (versão 6.0).

1160 As células foram classificadas como: células com membranas plasmática e acrossomal
1161 íntegras (não marcadas), células com membrana acrossomal lesionada e plasmática íntegra
1162 (marcadas apenas pelo FITC-PNA), células com membrana acrossomal íntegra e plasmática
1163 lesionada (marcadas apenas por IP) e as células com membranas acrossomal e plasmática
1164 lesionadas (duplamente marcadas).

1165

1166 *Análise estatística*

1167 Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. As variáveis expressas
1168 em porcentagem foram transformadas pelo método de arco-seno (arco seno $\sqrt{P/100}$). Os dados
1169 foram então testados para normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Quando necessário,
1170 transformação radicial [$\text{RQ}(X+1/2)$] ou logarítmica [$\log(X+1)$] foram realizadas. Em seguida,

1171 os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA one-way) e quando a
1172 variabilidade foi observada, o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer foi realizado.
1173 A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad InStat versão 3.10, 2009.
1174 Para todas as análises, o nível de significância foi de 5%.

1175

1176 3. RESULTADOS

1177 Os efeitos das diferentes concentrações de lecitina de soja (LS) em comparação à
1178 gema de ovo (TG) sobre as variáveis de cinética espermática foram apresentados na Tabela 1.
1179 Para as variáveis motilidade (total e progressiva) houve diferença ($p < 0,05$) entre o grupo TG e
1180 os grupos LS1, LS2 e LS3. Não houve diferença ($p > 0,05$) entre os grupos com LS.

1181 As variáveis LIN, STR e WOB apresentaram valores menores ($p < 0,05$) para as
1182 amostras diluídas em LS, quando comparados ao TG. Nenhuma diferença foi observada entre
1183 os grupos LS ($p > 0,05$).

1184 Os resultados de VCL e ALH foram maiores ($p < 0,05$) para os grupos LS, quando
1185 comparados ao grupo TG, mas não houve diferença ($p > 0,05$) entre os grupos LS. O grupo TG
1186 não diferiu ($p > 0,05$) dos grupos LS para as variáveis de VSL, VAP e BCF.

1187 Os resultados da integridade das membranas plasmática e acrossomal após a
1188 descongelamento foram apresentados na Figura 1. A proporção de espermatozoides com
1189 membranas plasmática e acrossomal íntegras foi maior ($p < 0,05$) nas amostras do grupo LS1
1190 ($42,83 \pm 0,96$) que no grupo TG ($30,82 \pm 5,44$). Entretanto, nenhuma diferença ($p > 0,05$) foi
1191 observada entre os grupos LS1 ($42,83 \pm 0,96$), LS2 ($39,42 \pm 2,76$) e LS3 ($39,11 \pm 6,21$).

1192

1193 4. DISCUSSÃO

1194 O processo de criopreservação pode ter um efeito prejudicial sobre a morfologia das
1195 células espermáticas (Nur *et al.*, 2010), uma vez que tem sido relatada ocorrência de lesões na
1196 membrana plasmática dos espermatozoides (Alvarez *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013; Pelufo *et*
1197 *al.*, 2015) e na integridade acrossomal (Nur *et al.*, 2010).

1198 Nossos resultados demonstram que as concentrações de lecitina de soja testadas
1199 apresentaram efeito negativo sobre as variáveis de cinética espermática, após os processos de
1200 congelação-descongelação. Resultados similares tem sido reportados por outros pesquisadores
1201 (Paz *et al.*, 2010; Forouzanfar *et al.*, 2010; Ustuner *et al.*, 2014) os quais argumentaram que a
1202 redução na motilidade espermática provavelmente ocorreu devido à elevada viscosidade e à
1203 presença de partículas de debris nos diluidores à base de lecitina de soja, sendo tóxico para a
1204 célula espermática (Forouzanfar *et al.*, 2010).

1205 Em contraste, resultados de estudos prévios revelaram que a substituição da gema de
1206 ovo por 1% e 1,5% de lecitina de soja resultou em melhores características de cinética,
1207 quando comparados ao diluidor à base de gema de ovo (Sharafi *et al.*, 2009; Emamverdi *et al.*
1208 2013; Salmani *et al.*, 2014). Estudos sobre criopreservação de sêmen ovino ou caprino não
1209 relataram diferenças nas taxas de viabilidade e motilidade entre os grupos gema de ovo e
1210 diluidores à base de lecitina (Forouzafar *et al.*, 2010; Salmani *et al.*, 2014). Estas divergências
1211 nos resultados provavelmente estão relacionadas às diferenças no tipo e na concentração de
1212 lecitina de soja utilizada, assim como nos métodos de preparação usados nos diferentes
1213 estudos, tendo em vista que a manipulação poderia alterar as características físicas da lecitina
1214 de soja (van Wagendonk-de Leeuw *et al.*, 2000; Badens *et al.*, 2001; Paz *et al.*, 2010).

1215 Os resultados deste estudo evidenciaram que o percentual de espermatozoides com
1216 membranas plasmática e acrossomal íntegras no grupo LS1 foi maior quando comparado ao

1217 diluidor à base de gema de ovo. Nossos resultados corroboram com os apresentados por
1218 Forouzanfar *et al.* (2010) e Emamverdi *et al.* (2013), os quais reportaram que diluidores à
1219 base de lecitina 1% e 1,5 %, respectivamente, apresentaram maior proporção de membrana e
1220 acrossoma íntegros do que diluidores à base de gema de ovo (Moussa *et al.*, 2002),
1221 possivelmente pela ação protetora da lecitina de soja aos fosfolipídios de membrana dos
1222 espermatozoides, aumentando a tolerância ao processo de criopreservação.

1223 Por outro lado, nenhuma diferença na integridade das membranas plasmática e
1224 acrossomal foram observadas entre as diferentes concentrações de lecitina de soja. Resultados
1225 similares foram relatados por Paz *et al.* (2010), para diluidores contendo 2% ou 3,5% de
1226 lecitina para armazenamento de sêmen a 15 e 5 °C, preparado da mesma maneira que neste
1227 experimento.

1228 Os processos de congelação e descongelação podem levar à deterioração das
1229 membranas devido à mudanças de fase de transição que ocorrem nas diferentes regiões da
1230 membrana espermática altamente especializada (Maxwell e Watson, 1996). Tem sido
1231 sugerido que a lecitina de soja protege os fosfolipídios da membrana espermática pela
1232 ocupação de sítios da membrana plasmática, aumentando a tolerância ao processo de
1233 congelação (Chelucci *et al.*, 2015). Estes eventos podem permitir que a membrana dos
1234 espermatozoides resista a danos durante a congelação (Blanco *et al.*, 2011). Esta melhoria da
1235 integridade e funcionalidade da membrana resultaria em melhor proteção para a função do
1236 espermatozoide, tais como o que foi observado neste estudo.

1237

1238 **5. CONCLUSÃO**

1239 A capacidade de proteção da lecitina de soja nas concentrações de 1, 2 e 3% mostra-se
1240 limitada durante a criopreservação de sêmen ovino, resultando em prejuízos nas variáveis de

1241 cinética espermática pós-descongelção. Por outro lado, o diluidor contendo lecitina de soja 1%
1242 confere maior proteção às membranas plasmática e acrossomal, quando comparado ao diluidor
1243 à base de gema de ovo. Neste sentido, destacamos a importância da realização de estudos *in*
1244 *vivo* para avaliar o impacto destes resultados sobre a fertilidade.

1245

1246 **6. REFERÊNCIAS**

- 1247 **Aires V.A., Hinsch K.D., Mueller-Schloesser F., Bogner K., Mueller-Schloesser S. &**
1248 **Hinsch E. 2003.** In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-
1249 based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*. 60(2): 269-279.
- 1250 **Alvarez M., Tamayo-Canul J., Anel E., Boixo J.C., Mata-Campuzano M., Martinez-**
1251 **Pastor F., Anel L. & De Paz P. 2012.** Sperm concentration at freezing affects post-thaw
1252 quality and fertility of ram semen. *Theriogenology*. 77(6): 1111–1118.
- 1253 **Badens E., Magnan C. & Charbit G. 2001.** Microparticles of soy lecithin formed by
1254 supercritical processes. *Biotechnology Bioengineering*, 72(2): 194–204.
- 1255 **Blanco J.M., Long J.A., Gee G., Wildt D.E. & Donoghue A. M. 2011.** Comparative
1256 cryopreservation of avian spermatozoa: benefits of non-permeating osmoprotectants and ATP
1257 on turkey and crane sperm cryosurvival. *Animal in Reproduction Science*. 123(3-4): 242-248.
- 1258 **Crespillo A.M., Sá Filho M.F., Dell’Aqua Jr J.A., Nichi M., Monteiro G.A., Avanzi B.**
1259 **R., Martins A. & Papa F.O. 2012.** Comparasion of *in vivo* fertilizing potential of bovine
1260 semen frozen in egg yolk or new lecithin based extenders. *Livestock Science*. 149: 1-6.
- 1261 **Chelucci S., Pasciu V., Succu S., Addis D., Leoni G.G., Manca M.E., Naitana S. &**
1262 **Berlinguer F. 2015.** Soybean lecithin-based extender preserves spermatozoa membrane
1263 integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. *Theriogenology*. 83(6):
1264 1064-1074.
- 1265 **Cseh S., Faigl V. & Amiridis G.S. 2012.** Semen processing and artificial insemination in
1266 health management of small ruminants. *Animal Reproduction Science*. 130(3-4): 187-192.
- 1267 **Emamverdi M., Zhandi M., Zare Shahneh, A., Sharafi M. & Akbari-Sharif A. 2013.**
1268 Optimization of Ram Semen Cryopreservation Using a Chemically Defined Soybean
1269 Lecithin-Based Extender. *Reproduction in Domestic Animals*. 48(6): 899-904.

- 1270 **Forouzanfar M., Sharafi M., Hosseini S.M., Ostadhosseini S., Hajian M., Hosseini L.,**
1271 **Abedi P., Nili N., Rahmani H.R. & Nasr-Esfahani M.H. 2010.** In vitro comparison of egg
1272 yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen.
1273 *Theriogenology*. 73(4): 480–487.
- 1274 **Gil J., Rodriguez-Irazoqui M., Lundeheim N., Söderquist L. & Rodríguez-Martínez H.**
1275 **2003.** Fertility of ram semen frozen in Bioexcell® and used for cervical artificial
1276 insemination. *Theriogenology*. 59(5-6): 1157-1170.
- 1277 **Maxwell W.M.C. & Watson P.F. 1996.** Recent progress in the preservation of ram semen.
1278 *Animal Reproduction Science*. 42: 55-65.
- 1279 **Mies Filho, A. (1987).** ‘Reprodução dos animais domésticos’. (Sulina Press: Porto Alegre.)
- 1280 **Moussa M., Martinet V., Trimeche A., Tainturier D. & Anton, M. 2002.** Low density
1281 lipoproteins extracted from hen egg yolk an easy method: crioprotective effect on frozen-
1282 thawed bull semen. *Theriogenology*. 57(6): 1695-1706.
- 1283 **Nur Z., Zik B., Ustuner B., Sagirkaya H. & Ozguden C.G. 2010.** Effects of different
1284 cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity. *Theriogenology*. 73(9):
1285 1267-1275.
- 1286 **Papa F.O., Felício G.B., Melo-Oña C. M., Alvarenga M.A., De Vita B., Trinque C.,**
1287 **Puoli-Filho J.N.P. & Dell’Aqua Jr J.A. 2011.** Replacing egg yolk with soybean lecithin in
1288 the cryopreservation of stallion semen. *Animal Reproduction Science*. 129(1-2): 73– 77.
- 1289 **Paulenz H., Söderquist L., Pérez-Pé R. & Berg K.A. 2002.** Effect of different extenders and
1290 storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Animal Reproduction Science*.
1291 57(2): 823-836.

- 1292 **Paz P., Estes M.C., Alvarez M., Mata M., Chamorro C.A. & Anel L. 2010.** Development
1293 of extender based on soybean lecithin for its application in liquid ram semen. *Theriogenology*.
1294 74(4): 663–671.
- 1295 **Pelugo V., López Armengol M.F., Malcotti V., Venturino A. & Aisen E.G. 2015.** Effects
1296 of glycerol and sugar mixing temperature on the morphologic and functional integrity of
1297 cryopreserved ram sperm. *Theriogenology*. 83(1): 144–151.
- 1298 **Salamon S. & Maxwell W.M.C. 2000.** Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*.
1299 62(1-3): 77-111.
- 1300 **Salmani H., Towhidi A., Zhandi M., Bareini M. & Shafari, M. 2014.** In vitro assesment of
1301 soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen.
1302 *Cryobiology*. 68(2): 276-280.
- 1303 **Sharafi M., Forouzanfar M., Hosseini S.M., Hajian M., Ostadhosseini S., Hosseini L.,**
1304 **Abedi P., Nili N., Rahmani H.R., Javaheri A.R. & Esfahani M.H.N. 2009.** *In Vitro*
1305 Comparison of Soybean Lecithin Based-Extender with Commercially Available Extender for
1306 Ram Semen Cryopreservation. *Journal of Fertility and Sterility*. 3(3): 149-152.
- 1307 **Ustuner B., Alçay S., Nur Z., Sagirkaya H. & Soylu M.K. 2014.** Effect of Egg Yolk and
1308 Soybean Lecithin on Tris-Based Extender in Post-Thaw Ram Semen Quality and *in vitro*
1309 Fertility. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 20(3): 393-398.
- 1310 **Van Wagendonk-De Leeuw A.M., Haring R.M., Kaal-Lansbergen L.M. & Den Daas**
1311 **J.H. 2000.** Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg
1312 yolk and soybean extract. *Theriogenology*. 54(1): 57–67.

1313 **Vidal A.H., Batista A.M., Silva E.C.B., Gomes W.A., Pelinca M.A., Silva S.V. & Guerra,**
1314 **M.M.P. 2013.** Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm
1315 cryopreservation. *Small Ruminat Research*. 109: 47-51.

1316 **Zhao B.T., Han D., Xu C.L., Luo M.J., Chang Z.L. & Tan J.H. 2009.** Protocol
1317 optimization for long-term liquid storage of goat semen in a chemically defined extender.
1318 *Reproduction in Domestic Animals*. 44(6): 865-872.

1319

1320

1321

Tabela 1. Características cinéticas do sêmen ovino congelado-descongelado em diluidor à base de Tris gema de ovo ou diferentes concentrações de lecitina de soja

Grupos	MT (%)	MP (%)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)
TG	56,17 \pm 5,16 ^a	31,72 \pm 5,70 ^a	63,79 \pm 7,34 ^a	83,16 \pm 3,18 ^a	76,51 \pm 6,15 ^a	86,92 \pm 9,22 ^b	55,94 \pm 11,77	66,94 \pm 12,02	2,52 \pm 0,25 ^b	11,83 \pm 1,27
LS1	38,33 \pm 7,73 ^b	8,41 \pm 2,51 ^b	40,03 \pm 5,32 ^b	61,28 \pm 6,00 ^b	65,21 \pm 4,22 ^b	111,32 \pm 12,66 ^a	44,94 \pm 9,87	72,78 \pm 11,13	3,67 \pm 0,42 ^a	11,20 \pm 1,45
LS2	37,39 \pm 9,94 ^b	10,16 \pm 4,00 ^b	41,69 \pm 4,65 ^b	63,30 \pm 7,33 ^b	67,33 \pm 1,95 ^b	111,62 \pm 8,63 ^a	49,33 \pm 10,38	77,28 \pm 8,28	3,58 \pm 0,43 ^a	11,72 \pm 0,42
LS3	37,81 \pm 12,65 ^b	10,53 \pm 5,50 ^b	44,20 \pm 2,56 ^b	63,41 \pm 5,69 ^b	67,07 \pm 4,42 ^b	107,64 \pm 14,44 ^a	49,02 \pm 5,66	72,48 \pm 12,38	3,69 \pm 0,19 ^a	11,62 \pm 0,72

a, b: Diferentes letras na mesma coluna representam diferenças ($p < 0,05$) entre tratamentos.

1322

1323

1324

1325

1326

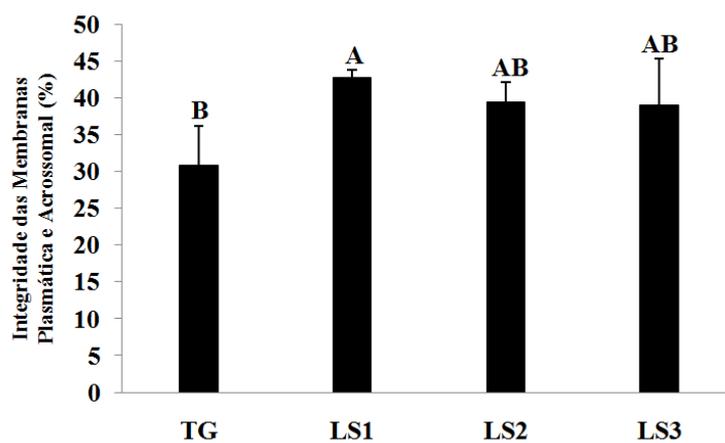


Figura 1. Integridade das membranas plasmática e acrossomal do sêmen ovino congelado-descongelado em diluidor à base de Tris gema de ovo ou diferentes concentrações de lecitina de soja.