

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS BOTUCATU/SP

EFEITOS DE DIFERENTES DILUENTES COMERCIAIS PARA CONGELAÇÃO
DE SÊMEN CANINO

DALMYR ROZA RODRIGUES

Botucatu – São Paulo
Maio/2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS BOTUCATU/SP

EFEITOS DE DIFERENTES DILUENTES COMERCIAIS PARA CONGELAÇÃO
DE SÊMEN CANINO

DALMYR ROZA RODRIGUES

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal. Orientador: Prof. Dr. José Antonio Dell'Aqua Jr.

Botucatu – São Paulo
Maio/2022

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Rodrigues, Dalmyr Roza.

Efeitos de diferentes diluentes comerciais para
congelamento de sêmen canino / Dalmyr Roza Rodrigues. -
Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia

Orientador: Jose Antonio Dellaqua Junior

Capes: 50504002

1. Cães - Reprodução. 2. Criopreservação. 3. Preservação
do sêmen. 4. Espermatozoides. 5. Gema de ovo.

Palavras-chave: Cães; Criopreservação; Espermatozoide; Gema
de ovo; Lecitina de soja.

DALMYR ROZA RODRIGUES

**EFEITOS DE DIFERENTES DILUENTES COMERCIAIS PARA CONGELAÇÃO
DE SÊMEN CANINO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal.

Banca examinadora Presidente e orientador: Prof. Dr. Jose Antonio Dell'Aqua Jr Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ- UNESP Botucatu/SP.

Prof^ª. Dr^ª. Fabiana Ferreira Souza
Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ- UNESP Botucatu/SP.

Prof^ª. Dr^ª. Priscila Nascimento Guasti
FAEF - Garça/SP

Botucatu – São Paulo
02 de Maio de 2022

DEDICATÓRIA

À minha esposa Rosa pelo apoio e incentivo que apesar das dificuldades sempre esteve ao meu lado.

E à meu filho por me dar ânimo de continuar lutando sempre.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por tornar possível esta jornada.

A todos que direta e indiretamente me apoiaram.

Ao meu orientador José Antonio Dell'Aqua Junior pela colaboração e dedicação, que mesmo em meio a pandemia me orientou e me proporcionou a realização deste projeto.

A Camila Freitas pela paciência e ajuda nas análises e conselhos durante o projeto.

Aos colegas da pós que contribuíram de alguma forma para que este projeto fosse concluído.

A toda a equipe da Unesp em especial da reprodução.

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

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Configuração do CASA para análise de sêmen de cães	37
TABELA 2 - Média $\pm$ erro padrão da média da avaliação computadorizada do movimento espermático realizado pelo CASA (Hamilton Thorne Research, IVOS 12) da análise de sêmen descongelado de 10 cães, congelados com 3 diferentes meios de congelação (Gema1, Gema2 e Lecitina)	42
TABELA 3 - Média $\pm$ erro padrão da média da avaliação por citometria de fluxo (BD LSR Fortessa) da análise de sêmen descongelado de 10 ejaculados de cães, congelados com 3 diferentes meios de congelação (Gema1, Gema2 e Lecitina)	43
TABELA 4 - Média $\pm$ erro padrão da média da avaliação computadorizada do movimento espermática realizado pelo CASA (Hamilton Thorne Research, IVOS 12) da análise de sêmen descongelado de 15 ejaculados de cães, congelados com 2 diferentes meios diluentes de congelação (Gema1 e Gema2)	44
TABELA 5 - Média $\pm$ erro padrão da média da avaliação por citometria de fluxo (BD LSR Fortessa) da análise de sêmen descongelado de 15 ejaculados de cães, congelados com 2 diferentes meios diluentes de congelação (Gema1 e Gema2)	44

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1

FIGURA 1 - Estrutura da membrana plasmática formada por uma bicamada lipídica..16

CAPITULO 2

FIGURA 1 - Delineamento experimental do processamento das amostras.....36

FIGURA 2 - Gráficos contour-plot representativos da análise das membranas plasmática e acrossomal realizada após descongelação do sêmen de cães congelados com diferentes meios de congelação, Gema1, Gema2 e Lecitina39

FIGURA 3 - Gráficos contour-plot representativos da análise da estabilidade de membrana plasmática realizada após descongelação do sêmen de cães congelados com diferentes meios de congelação, Gema1, Gema2 e Lecitina40

FIGURA 4 - Histogramas representativos da análise de potencial mitocondrial realizada após descongelação do sêmen de cães congelados com diferentes meios de congelação, respectivamente Gema1, Gema2 e Lecitina40

LISTA DE ABREVIATÖES

ANOVA = análise de variância

AU = unidade arbitrária

CASA = computer-assisted sperm analysis

ng = nanograma

µL = microlitro

mM = milimol

µg = microgramas

mL = mililitro

LIN = linearidade

LH = hormônio luteinizante

MP = motilidade progressiva (%)

MPAI = membrana plasmática e acrossomal íntegras (%)

MPAL = membrana plasmática e acrossomal lesadas (%)

MPIAL = membrana plasmática íntegra e acrossomal lesada (%)

MPLAI = membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra (%)

MT = motilidade total (%)

RAP = espermatozoides com movimento rápido (%)

RPM = rotações por minuto

STR = retilinearidade

VAP = velocidade de trajeto

VCL = velocidade curvilínear (µm/s)

VSL = velocidade linear (µm/s)

Sumário

CAPITULO 1	xiii
1 Introdução	14
2. Revisão de literatura	15
2.1 Danos causados ao espermatozoide pela criopreservação	16
2.2 Meios diluentes para congelamento de sêmen canino	18
2.2.1 Crioprotetores intra e extracelulares	19
2.2.2 Gema de ovo e Lecitina de soja.....	20
3. Considerações finais.....	21
Referências.....	22
CAPITULO 2	29
ARTIGO	30
1 Introdução	32
2 Materiais e métodos.....	33
2.1 Colheita das amostras	34
2.2 Manipulação e preparo das amostras	34
2.3 Congelamento	35
2.4 Descongelamento.....	35
2.5 Avaliação espermática pós-descongelamento.....	36
2.5.1 Avaliação da cinética espermática.....	36
2.5.2 Avaliação das alterações de membrana plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial	37
2.5.3 Integridade de membrana espermática e acrossomal	38
2.5.4 Fluidez de membrana	39
2.5.5 Potencial mitocondrial.....	40
2.6 Análise estatística.....	41
3 Resultados	41
3.1 Experimento 1	41
3.2 Experimento 2	43
4 Discussão.....	45
5 Conclusão	47
Referências.....	48

RODRIGUES, D.R. EFEITOS DE DIFERENTES DILUENTES COMERCIAIS PARA CONGELAÇÃO DE SÊMEN CANINO. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal. Botucatu – SP 2022

RESUMO

O uso de sêmen congelado depende que sejam mantidos alguns atributos espermáticos para se obter sucesso na fertilização do oócito, e a adição de substâncias crioprotetoras promovem proteção ao espermatozoide durante a congelação. A criopreservação induz uma série de modificações físicas e bioquímicas nos espermatozoides que levam a alterações na célula espermática. Estas alterações estão associadas à perda da motilidade, ruptura da membrana plasmática e acrossomal, estresse oxidativo, entre outras, promovendo danos irreversíveis ao espermatozoide. Além de fatores relacionados a cadela, como momento da ovulação, oócitos imaturos, e local de inseminação, a utilização de sêmen canino criopreservado é prejudicada pela viabilidade espermática pós-descongelação, que em muitas vezes pode ser baixa em decorrência de danos tanto na estrutura quanto na função dos espermatozoides e podem ser atribuídos ao choque térmico durante a congelação. Esses danos podem ser diminuídos com o uso de diluentes adequados para a criopreservação. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar a eficácia de três diluentes comerciais para congelação de sêmen canino, sendo 2 a base de gema de ovo (Gema1 e Gema2) e 1 a base de lecitina de soja (Lecitina), sobre a qualidade espermática pós-descongelação. O estudo foi dividido em 2 experimentos, no experimento 1 foram 10 animais utilizados. Após a colheita, cada ejaculado foi dividido em 3 alíquotas iguais, diluídos nos respectivos meios de congelação na concentração de 100×10^6 espermatozoides/mL, envazados em palhetas de 0,5mL, submetidos à congelação obedecendo os critérios de estabilização de acordo com os fabricantes, e armazenadas em nitrogênio líquido. No experimento 2, foram selecionados os dois melhores diluentes do experimento 1 para nova avaliação

e comparação, aumentando o número de amostras diminuindo assim o erro amostral, então foram adicionados mais 5 animais aumentando o número de amostras em 50%. A descongelação foi realizada a 37°C por 30 segundos. As amostras foram submetidas a análise computadorizada da cinética espermática pelo CASA e integridade das membranas e potencial mitocondrial por citometria de fluxo após descongelação. No experimento 1 os diluentes a base de gema de ovo apresentaram resultado significativamente superior em comparação ao meio a base de lecitina de soja, para os parâmetros de motilidade total, motilidade progressiva, espermatozoides com movimento rápido, integridade de membrana plasmática e acrossomal, estabilidade de membrana plasmática, e alto potencial mitocondrial. No experimento 2, os 2 melhores diluentes do experimento 1 foram os dois a base de gema de ovo, e houve diferença significativa entre os meios que apresentaram motilidade total de $59,9\% \pm 3,3$ e $52,3\% \pm 2,2$ para Gema1 e Gema2 respectivamente, na avaliação da membrana por citometria o meio Gema1 também apresentou melhores resultados que o meio Gema2, $54,5\% \pm 3,3$ e $45,0\% \pm 4,0$ para integridade de membrana plasmática e acrossomal, e $47,6\% \pm 4,5$ e $37,3\% \pm 3,5$ para estabilidade de membrana plasmática respectivamente. Em conclusão pode-se afirmar que a lecitina de soja não atingiu resultados satisfatórios para os parâmetros espermáticos avaliados comparados a gema de ovo, e entre os meios a base de gema de ovo o meio Gema1 apresentou resultados superiores para os parâmetros avaliados pós-descongelação para espécie canina.

Palavra-chave: Criopreservação, Espermatozoide, Cães, Gema de Ovo, Lecitina de Soja, Inseminação Artificial

RODRIGUES, D.R. EFFECTS OF DIFFERENT COMMERCIAL DILUENTS FOR CANINE SEMEN FREEZING. Dissertation presented to the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Campus of Botucatu, as part of the requirements for obtaining a Master's degree in the Postgraduate Program in Animal Biotechnology. Botucatu - SP 2022

ABSTRACT

The use of frozen semen depends on maintaining some sperm attributes for successful fertilization of the oocyte, and the addition of cryoprotective substances promotes protection to the sperm during freezing. Cryopreservation induces a series of physical and biochemical changes in sperm that lead to changes in the sperm cell. These changes are associated with loss of motility, rupture of the plasma and acrosomal membrane, oxidative stress, among others, promoting irreversible damage to the sperm. In addition to factors related to the bitch, such as time of ovulation, immature oocytes, and site of insemination, the use of cryopreserved canine semen is impaired by post-thawing sperm viability, which can often be low due to damage to both structure and structure. in sperm function and can be attributed to heat shock during freezing. These damages can be reduced with the use of diluents suitable for cryopreservation. Thus, the objective of this study is to evaluate the effectiveness of three commercial extenders for canine semen freezing, 2 of which are egg yolk based (Gema1 and Gem2) and 1 are soy lecithin (Lecithin) on sperm quality post-thawing. The study was divided into 2 experiments, in experiment 1 10 animals were used. After collection, each ejaculate was divided into 3 equal aliquots, diluted in the respective freezing media at a concentration of 100×10^6 spermatozoa/mL, poured into 0.5mL straws, subjected to freezing according to the stabilization criteria according to the manufacturers, and stored in liquid nitrogen. In experiment 2, the two best diluents from experiment 1 were selected for further evaluation and comparison, increasing the number of samples, thus decreasing the sampling error, then 5 more animals were added, increasing the number of samples by 50%. Thawing was performed at 37°C for 30 seconds. The samples were submitted to computerized analysis of sperm kinetics by CASA and

membrane integrity and mitochondrial potential by flow cytometry post-thawing. In experiment 1, the egg yolk-based extenders presented a significantly superior result compared to the soy lecithin-based medium, for the parameters of total motility, progressive motility, fast moving spermatozoa, plasma and acrosomal membrane integrity, stability of plasma membrane, and high mitochondrial potential. In experiment 2, the 2 best extenders of experiment 1 were both egg yolk-based, and there was a significant difference between the media that showed total motility of $59.9\% \pm 3.3$ and $52.3\% \pm 2.2$ for Gema1 and Gema2 respectively, in the evaluation of the membrane by cytometry, the Gema1 medium also presented better results than the Gema2 medium, $54.5\% \pm 3.3$ and $45.0\% \pm 4.0$ for plasma and acrosomal membrane integrity, and $47.6\% \pm 4.5$ and $37.3\% \pm 3.5$ for plasma membrane stability respectively. In conclusion, it can be stated that soy lecithin did not achieve satisfactory results for the evaluated sperm parameters compared to egg yolk, and among the egg yolk-based medium, the Gema1 medium showed superior results for the parameters evaluated after thawing for canine species

Keywords: Cryopreservation, Sperm, Dogs, Egg Yolk, Soy Lecithin, Artificial Insemination

CAPITULO 1

1 Introdução

A criopreservação do material genético é de suma importância, tanto para a preservação de espécies selvagens ameaçadas de extinção, como para manter uma reserva genética mesmo em espécies não ameaçadas de extinção como por exemplo o Cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), formando um banco criogênico para o futuro das espécies (MACHADO, 2016), e de cães de raça pura com alto valor zootécnico visando o melhoramento genético das raças (LUCIO, 2012; CERDEIRA *et al.*, 2020; QAMAR, 2020). Além de prevenir doenças sexualmente transmissíveis, possibilita a utilização do material genético do cão independente das barreiras geográficas (MAHIDDINE e KIM, 2021).

Durante a criopreservação o sêmen apresenta queda na qualidade pós-descongelamento. Parte desta perda é decorrente das alterações na membrana celular (SICHERLE *et al.*, 2020; KIM *et al.*, 2021), em consequência de diversos fatores, entre estes podemos destacar o choque térmico que pode propiciar a formação de cristais de gelo no interior da célula espermática (LUCIO *et al.*, 2016; MAHIDDINE *et al.*, 2020) e a diferença na pressão osmótica intra e extracelular que pode alterar o tamanho da célula causando o rompimento da membrana (SILVA, 2006; MAHIDDINE *et al.*, 2020). Para minimizar estes efeitos é necessário que diminua a quantidade de água do interior da célula (DALCIN e LUCCI, 2010).

Dessa forma a adição do meio diluente crioprotetor para congelamento ao sêmen promove uma melhor qualidade espermática pós-descongelamento. As substâncias crioprotetoras podem ser intracelular ou extracelular. O crioprotetor intracelular é capaz de penetrar na célula e retirar a água intracelular (CASTRO *et al.*, 2011; LENZ *et al.*, 2018) e liga-se ao hidrogênio das moléculas de água restantes aumentando a viscosidade do líquido intracelular e assim diminui a formação de cristais de gelo durante o processo de congelamento, o que poderia causar danos irreversíveis a célula (CASTRO *et al.*, 2011). O crioprotetor extracelular promove um aumento da osmolaridade do meio extracelular favorecendo a saída da água intracelular contribuindo para a diminuição da formação de cristais de gelo no interior da célula espermática (SIEWERT *et al.*, 2018), existem uma grande quantidade de substâncias utilizadas como agentes

crioprotetores extracelulares como o leite desnatado, água de coco, gema de ovo e lecitina de soja (SANTOS *et al.*, 2016).

A gema de ovo é uma substância crioprotetora extracelular, e seu mecanismo de ação não foi totalmente elucidado, sabe-se que é uma lipoproteína de baixa densidade (LDL) e interage com a membrana espermática auxiliando na sua estabilidade diminuindo a ocorrência de desequilíbrio osmótico (BENCHARIF *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2020; GLORIA *et al.*, 2020). A gema de ovo tem a desvantagem de ser de origem animal tendo mais chances de contaminação (BENCHARIF *et al.*, 2012; CALABUIG *et al.*, 2017; SUN *et al.*, 2020).

A lecitina de soja também é uma substância crioprotetora extracelular e surge como uma alternativa de origem vegetal diminuindo o risco de contaminação (SILVA e GUERRA, 2011; RODRIGUES, 2014), porém sua utilização apresenta resultados inferiores em comparação com a gema de ovo (PAPA *et al.*, 2011; SILVA e GUERRA, 2011; RODRIGUES, 2014).

Devido a grande variabilidade das substâncias crioprotetoras e da composição dos diluentes comerciais existe a necessidade de avaliar e aprimorar os meios diluentes para que seja possível manter a qualidade espermática pós-descongelação e consequentemente obter uma melhor taxa de prenhez nos programas de reprodução assistida na espécie canina. O objetivo deste estudo foi avaliar e comparar o resultado pós-descongelação do sêmen canino submetido a congelamento com três diluentes comerciais próprios para congelamento a base de gema de ovo e lecitina de soja, a fim de estabelecer qual o meio crioprotetor é mais indicado para espécie canina, isto é, o diluente crioprotetor que melhor mantém a qualidade espermática pós-descongelação.

2. Revisão de literatura

Com a descoberta feita por Polge *et al.* em 1949 do efeito crioprotetor do glicerol sob a célula espermática possibilitou que Stewart em 1951 congelasse pela primeira vez o sêmen de touro (SHUKLA, 2020), e no ano de 1954 Rowson conseguisse com sucesso a congelamento do sêmen canino, no ano de 1969

Seager conseguiu a primeira gestação da espécie canina por meio de sêmen criopreservado (SILVA *et al.*, 2001).

A criopreservação do sêmen é dividida em várias etapas e todas merecem atenção (LUCIO *et al.*, 2016), a colheita do sêmen, a análise do sêmen in natura, o processamento, a adição do crioprotetor, a refrigeração e a congelação são etapas que podem promover a queda na qualidade espermática caso não sejam executadas corretamente (CASTELO *et al.*, 2008).

2.1 Danos causados ao espermatozoide pela criopreservação

A criopreservação do sêmen promove queda na qualidade espermática pós-descongelação em razão de diversos fatores, como, alteração na estrutura da membrana lipídica levando a alteração da permeabilidade da bicamada lipídica (CSERMAK JR *et al.*, 2018; SICHERLE *et al.*, 2020; KIM *et al.*, 2021). A membrana espermática segue os modelos básicos de membranas biológicas, com uma bicamada de fosfolipídios (Figura 1) com proteínas associadas (BORGES *et al.*, 2011), porém a membrana espermática sofre pequenas alterações desde a espermatogênese até sua capacitação (LENZI *et al.*, 1996). Sicherle *et al.* (2020) observaram aumento na permeabilidade nas membranas plasmáticas, e um aumento de membranas comprometidas, as membranas acrossomais também foram afetadas observando uma diminuição de células intactas, e uma queda no potencial mitocondrial dos espermatozoides submetidos ao processo de congelação e descongelação.

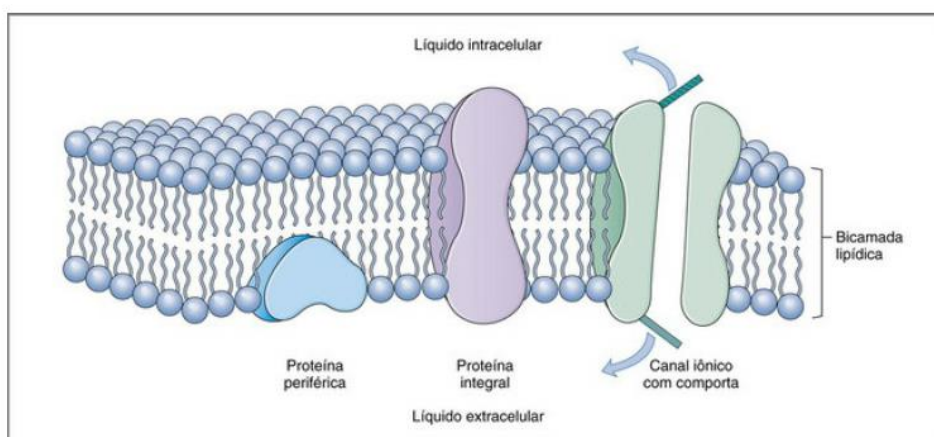


FIGURA 1 – Estrutura da membrana plasmática formada por uma bicamada lipídica. (Constanzo 2014)

A motilidade espermática e a fertilização do oócito pelo espermatozoide é diretamente afetada pela integridade da membrana plasmática e acrossomal, que pode ser afetada dependendo de sua composição (Farstad, 2009; Lucio *et al.*, 2017).

A formação de cristais de gelo durante o processo de criopreservação é um fator determinante que pode ocasionar a ruptura da membrana e das estruturas intracelulares (SANTOS *et al.*, 2016; GUIMARÃES *et al.*, 2018; TONIOLLI e CANTANHÊDE, 2019). A curva de refrigeração pode influenciar na formação dos cristais, se a curva for muito rápida as células espermáticas não perdem água suficiente aumentando a incidência dos cristais (GUIMARÃES *et al.*, 2018). CERDEIRA *et al.* (2020) compararam o processo de congelação com a vitrificação e apesar da vitrificação aparentemente oferecer menos danos a membrana, promove maiores danos mitocondriais e na cauda espermática, causando danos maiores aos espermatozoides comparado a congelação convencional.

A barreira a ser vencida pelos espermatozoides não é a capacidade de suportar os -196°C de armazenamento em nitrogênio líquido, mas a capacidade de suportar temperaturas intermediárias de 15°C à -60°C durante a congelação e descongelação (MAZUR, 1984). A fase mais crítica é denominada de “tempo de equilíbrio” que é a estabilização à 5°C , por isso a etapa de resfriamento é importante para o processo de congelação do sêmen (ANDRADE *et al.*, 2019; SHUKLA, 2020).

A qualidade espermática pós-descongelação é essencial para fertilização do oócito, tanto para qualidade da cinética espermática quanto da integridade de membrana plasmática e acrossomal, e potencial mitocondrial, portanto, a definição de qual diluente de congelação promove melhor proteção ao espermatozoide é fundamental para o sucesso na reprodução assistida na espécie canina (KUSUM *et al.*, 2020). A cadela ovula em média 2 dias após o pico de LH que pode ser definido com a dosagem de progesterona sérica, isto é, quando apresenta valores de progesterona entre 1,5 e 2,5 ng/mL indica o pico de LH (MUKAI *et al.*, 2020), podendo ovular em até 72h após o pico de LH (FELDMAN e NELSON, 2004; PHEMISTER *et al.*, 1973). Além desta variabilidade quanto ao momento da ovulação, a cadela ovula oócitos imaturos e cerca de 24h-48h após a ovulação atingem a maturidade na tuba uterina e se

tornam aptos a serem fertilizados (SILVA e LIMA, 2018). Então, o sucesso na fertilização do oócito pelo espermatozoide criopreservado depende da preservação de alguns atributos indispensáveis, como, metabolismo para produção de energia, motilidade progressiva, enzimas acrossomais, e integridade da membrana plasmática (CHIRINEA *et al.*, 2013).

Os efeitos deletérios da congelação e descongelação, tais como formação de cristais de gelo, desidratação celular, choque térmico e danos a membrana espermática são os principais problemas a serem combatidos com a adição dos crioprotetores, diluidores e curva de congelamento (OLIVEIRA *et al.*, 2013). O uso de substâncias que diminuam o efeito maléfico da criopreservação é uma necessidade para que se obtenha uma maior taxa de prenhez quando se utiliza sêmen congelado (OLIVEIRA *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2019).

2.2 Meios diluentes para congelação de sêmen canino

A composição do diluente utilizado para criopreservação do sêmen canino é um fator determinante para o sucesso no processo de criopreservação. Os diluentes são compostos por diversas substâncias como: crioprotetores intracelulares (glicerol, dimetilsilfóxido (DMSO), etilenoglicol), extracelulares (gema de ovo, leite desnatado, lecitina de soja), açúcares como fonte de energia, sais, antibióticos e substâncias tamponantes (LUCIO, 2012; SANTOS *et al.*, 2016; ROSA, 2018).

Alguns componentes estão sendo muito utilizados na preservação do sêmen canino. Diluentes que contenham TRIS (Tris-hidroxymethyl-aminometano) apresentam resultado satisfatório (LIMA *et al.*, 2019), o TRIS é uma solução tampão (CASTELO *et al.*, 2008; CSERMAK JR *et al.*, 2018), tem alto grau de pureza e está disponível comercialmente facilitando seu uso e servindo de base para vários diluentes, onde se adicionam fontes de energia para os espermatozoides, anti-oxidantes, e protetores de membrana (CASTELO *et al.*, 2008). A composição dos diluentes para congelação na espécie canina pode ser fator fundamental para o sucesso durante os protocolos de inseminação artificial com sêmen congelado, mas existem diversos meios diluentes crioprotetores para congelação para espécie canina (SHAKOURI *et al.*, 2021).

2.2.1 Crioprotetores intra e extracelulares

Os crioprotetores intracelulares (penetrantes) tem baixo peso molecular e tem a capacidade de penetrar na célula (CASTRO *et al.*, 2011), através desta característica tem a função de penetrar na célula espermática retirar a água intracelular minimizando a formação de cristais de gelo no interior da célula espermática (LENZ *et al.*, 2018; TONIOLLI e CATANHEDE, 2019). Os crioprotetores intracelulares são osmoticamente inativos, mas sua adição provoca um estresse osmótico inicial, pois a água se move mais rapidamente através da membrana causando um desequilíbrio osmótico até sua estabilização (SIEME *et al.*, 2016).

Glicerol, etilenoglicol, dimetilfóxico (DMSO) são exemplos de crioprotetores intracelulares (CASTRO *et al.*, 2011; LENZ *et al.*, 2018), apesar de sua toxicidade o glicerol é o crioprotetor intracelular mais utilizado em cães (CASTRO *et al.*, 2007; ACIPRESTE *et al.*, 2014; GUANGA *et al.*, 2019), atua entrando no interior da célula espermática promovendo a saída de água diminuindo assim o risco de formação de cristais de gelo e consequentemente diminuindo o risco de danos ao espermatozoide (PAUL *et al.*, 2021).

Para manter a funcionalidade espermática a membrana celular precisa ser protegida contra os danos mecânicos causados pela formação de cristais de gelo durante o processo de congelamento e descongelamento (YOSHIDA *et al.*, 2021).

Crioprotetores extracelulares (não penetrantes) são substâncias com alto peso molecular o que os impede de penetrar na célula (TONIOLLI E CANTANHÊDE, 2019), atuam na membrana celular estabilizando e protegendo dos danos causados pelo processo de criopreservação (JARK *et al.*, 2016), formam uma proteção externa na membrana diminuindo as injúrias causadas pela desidratação que ocorrem durante a congelamento (MOTTA *et al.*, 2014). Os crioprotetores extracelulares podem ligar-se as moléculas de água por interações moleculares, como ligações de hidrogênio diminuindo o ponto de congelamento e consequentemente diminuindo a probabilidade de formação de cristais de gelo (YANG *et al.*, 2022). A gema de ovo é o crioprotetor extracelular mais utilizado nos mamíferos, mas existem uma grande quantidade de substâncias utilizadas como: leite desnatado, água de coco, lecitina de soja (SANTOS *et al.*, 2016).

2.2.2 Gema de ovo e Lecitina de soja

A gema de ovo é um crioprotetor extracelular (não penetrante), apresenta bons resultados apesar da desvantagem de ser um produto de origem animal e ser mais susceptível a contaminação (LIMA *et al.*, 2019), outra desvantagem da gema de ovo é sua composição que pode variar de acordo com sua origem (CALABUIG *et al.*, 2017; DOMAIN *et al.*, 2019; PEARODWONG, 2019). Apesar do mecanismo de ação da gema de ovo como agente crioprotetor não estar totalmente elucidado, sabe-se que a gema de ovo atua na crioproteção do espermatozoide através da lipoproteína de baixa densidade presente nela (BENCHARIF *et al.*, 2012; MADEIRA *et al.*, 2013; GLORIA *et al.*, 2020; SUN *et al.*, 2020), a qual tem importante função ligando-se na membrana espermática aumentando sua resistência ao choque térmico e auxiliando na motilidade pós-descongelamento (BENCHARIF *et al.*, 2012; JARK *et al.*, 2016).

Estudos anteriores indicam que a adição da gema de ovo como agente crioprotetor diminui os danos na célula espermática (GLORIA *et al.*, 2020), e previne a capacitação e reação acrossomal no espermatozoide criopreservado (SOMI *et al.*, 2021). Grandhay *et al.* (2020) adicionaram Metformina que é uma molécula sintética que modula o metabolismo celular através da atividade mitocondrial ao diluente a base de gema de ovo obtendo resultados satisfatórios, sugerindo uma alternativa para cães que apresentem sêmen de baixa qualidade conseguindo uma melhor motilidade e melhor fertilidade.

A lecitina de soja tem função semelhante a gema de ovo no processo de criopreservação, pois também é uma lipoproteína de baixa densidade ligando-se a membrana espermática, tornando-se uma alternativa viável à gema de ovo por ser de origem vegetal diminuindo os riscos de contaminação e favorecendo o processo de padronização (DALMAZZO *et al.*, 2018). A lecitina de soja é uma fosfatidilcolina poli-insaturada com componentes que suprem as funções energéticas estruturais de todas as membranas biológicas atuando na diferenciação, proliferação e regeneração celular (RODRIGUES, 2014), a fosfatidilcolina não é uma molécula única e sim uma família de moléculas, e por ser de origem vegetal os fosfolípidios da lecitina de soja são mais ricos em gorduras insaturadas que a gema de ovo podendo aumentar a permeabilidade

da membrana espermática e resistência ao choque térmico (CALABUIG *et al.*, 2017).

Nguyen *et al.* (2019) compararam diluentes contendo lecitina de soja com a gema de ovo na qualidade espermática canina para sêmen refrigerado e obtiveram um resultado positivo significativo para o diluente com gema de ovo, tal resultado pode ser explicado pelo fato da gema de ovo conter fosfolipídios e proteínas em sua composição e a lecitina de soja praticamente só lipídeos, já em um estudo realizado por Reed *et al.* (2009), com espermatozoides humanos a lecitina de soja mostrou ser eficiente no processo de criopreservação.

Apesar de o meio diluente ser um dos maiores responsáveis pelo sucesso no processo de criopreservação, a falta de estudos e conseqüentemente a falta de um protocolo padrão para a criopreservação do sêmen canino pode influenciar negativamente no resultado final (SILVA *et al.*, 2018).

3. Considerações finais

Sabendo do potencial e necessidade da preservação do material genético da espécie canina para aprimoramento a manutenção das raças, do grande avanço nas biotecnologias da reprodução, e sabendo também da queda de qualidade espermática quando o sêmen é submetido ao processo de congelação, temos a necessidade de avaliar os meios crioprotetores para saber qual é o mais indicado para a espécie canina e assim melhorar a qualidade espermática pós-descongelação.

Referências

- ACIPRESTE A.C., COSTA E.P., OLIVEIRA F.A., COSTA S.L., SILVA T.F., BERETTA D.C. Avaliação da eficácia de crioprotetores permeantes e não permeantes no descongelamento rápido e lento do sêmen canino. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.15, n.1, p.107-114, jan./mar. 2014.
- ANDRADE A.F.C., PEDROSA A.C., PASSARELLI M.S., MARTINS S.M.M.K. Protocolos e possibilidades de criopreservação de sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.43, n.2, p.89-96, abr./jun. 2019.
- BENCHARIF D., BRIAND L.A., GARAND A., ANTON M., SCHMITT E., DESHERCES S., DELHOMME G., LANGLOIS M.L., BARRIÈRE P., DESTRUMELLE S., MUNOZ O.V., TANTURIER D. The advantages of using a combination of LDL and glutamine in comparison with TRIS egg yolk and Equex® STAMP extenders in the cryopreservation of canine semen. **Research in Veterinary Science**, v.93, p.440-447, 2012.
- BERGSTEIN T.G., WEISS R.R., BICUDO S.D. Técnicas de análise de sêmen. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.38, n.4, p.189-194, Belo Horizonte, out./dez. 2014
- BORGES J.C., SILVA M.R., GUIMARÃES J.D., ESPER C.R., FRANCESCHINI P.H. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.3, p.303-314, jul./set. 2011.
- CALABUIG M.J.S., MAILLO V., BREÑA P.B., MARTÍNEZ J.F., CARRILLO S.G., GUTIÉRREZ J.F.P., CEREZALES S.P. Cryopreservation of canine sperm using egg yolk na soy bean based extenders. **Reproductive Biology**, v.17, p.233-238, 2017.
- CASTELO T.S.; FROTA T.R.; SILVA A.R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos, 2008. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, n.3, p.67-75, 2008.
- CASTRO A.C.N., PACHECO, A., SILVA D.B., GONDIM D.S., PINHO T.G. Viabilidade do sêmen submetido a criopreservação com glicerol e etileno-glicol. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.14, n.2, p.122-124, 2007.
- CASTRO S.V., CARVALHO A.A., SILVA C.M.G., FAUSTINO L.R., FIGUEIREDO J.R., RODRIGUES A.P.R. Intracellular Cryoprotectant Agents: Characteristics and Use of Ovarian Tissue and Oocyte Cryopreservation. **Acta Science Veterinariae**, v.39, n.2, p.957, 2011.

CERDEIRA J., SÁNCHEZ-CALABUIG M.J., PÉREZ-GUITIÉRREZ J.F., HIJON M., CASTAÑO C., SANTIAGO-MORENO J. Cryopreservation effects on canine sperm morphometric variables and ultrastructure: Comparison between vitrification and conventional freezing. **Cryobiology**, v. 95, p.164-170, ago 2020.

CHIRINEA V.H.; SICHERLE C.C.; LOPES M.D. Congelamento de sêmen e sua eficiência na inseminação de cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.37, n.2, p.164-168, Abr/Jun 2013

COSNTANZO L.S. **Fisiologia** 5th ed. Tradução, Elsevier 2014.

CSERMAK JR. A.C., PAULA T.A., COSTA E.P., GUIMARÃES J.D., FERREIRA L.B.C, ARAUJO G.R., DECO-SOUZA T., GARAY R.M. Use of combination of fluorescent probes to identify sperm subpopulations for quality assessment of fresh and cryopreserved canine sêmen. Preliminary results. **Journal of Veterinary Andrology**, v.3, n.1, p.19-25, January/June 2018.

DALCIN L.; LUCCI C.M. Criopreservação de embriões de animais de produção: princípios criobiológicos e estado atual. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 34, n. 3, p. 149-159, jul./set. 2010.

DALMAZZO A. ANGRIMANI D.S.R., LOSANO J.D.A., ROCHA C.C., SOBRINHO C.A.B., GURGEL J.R.C., PACHECO P.I.M., MINAZAKI C.K., CRUSCO S.E., NICHI M., BARNABE V.H. Insights into soy lecithin and egg yolk-based extenders for chilling canine spermatozoa. **Zygote**, v.27, n.1, p.17-24, 2018. doi: 10.1017/S0967199418000576.

DOMAIN G., WYDOOGHE E., BROECKX B.J.G., HOOGEWIJS M., SOOM A.V. Semen donation and establishment of an open canine semen bank: a novel tool to prevent inbreeding in pedigree dogs. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, v.88, 2019.

FARSTAD W. Cryopreservation of canine semen – new challenges. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n.2, p. 336-341. 2009.

FELDMAN E.C., NELSON R.W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. 3th ed. Saunders Elsevier Science (USA), 2004.

GLORIA A., ZAMBELLI D., CARLUCCIO A., CUNTO M., PONZIO P., CONTRI A. Is the protective effect of egg yolk against osmotic and cryogenic damage on dog spermatozoa dose-dependent? **Animal Reproduction Science**, v.213, 2020.

GRANDHAYE J., PARTYKA A., LIGOCKA Z., DUDEK A., NIZANSKI W., JEANPIERRE E., ESTIENNE A., FROMENT P. Metformin improves quality of post-thaw canine semen. **Animals**, v.10, p.287, 2020.

GUANGA L.A., PEÑA G.G., ALEMÁN F.C., CARPIO R.R., ESCANDÓN P.N., ORTIZ G.C. Centrifugación coloidal como método de selección espermática previo a la criopreservación com glicerol em caninos. **Revista de Producción Animal**, v.31, n.1, p.37-46, 2019.

GUIMARÃES D.B., BARROS T.B., CATANHÊDE L.F., FEUGANG J.M.N., SOUZA L.P., TONIOLLI R. Qualidade espermática durante a curva de resfriamento do sêmen suíno diluído em água de coco em pó visando sua criopreservação. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.19, p.1-16, 2018.

JARK P.C., RAPOSO T..M.M., TRINDADE A.B., MACENTE B.I., ALVES A.E., APPARÍCIO M. Criopreservação de tecidos gonadais para conservação da fertilidade em canídeos e felídeos: realidade ou promessa? **Investigação**, v.15, n.9, p.14-20, 2016.

KIM E., ALMUBARAK A., TALHA N., YU I., JEON Y. The Use of γ -Carrageenan in Egg Yolk Free Extender Improves the Efficiency of Canine Semen Cryopreservation. **Animals**, v.12, n.1, 2021. 88.
<https://doi.org/10.3390/ani12010088>

KUSUM K., KUMAR H., MISHRA R.P., KUMAR B., SAURBH. Effect of different cryoprotectants in cryopreservation of dog sêmen: a review. **Journal of Animal Research**, v.10, n.6, p.859-867, dec. 2020.

LENZ D.R., LIMA M.C.C., PRADO T.F., VICTORIO A.M., PAULA F.G., MEIRINHOS M.L.G., ARNHOLD E. Avaliação de diferentes crioprotetores em tempos de descongelamento de sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.42, n.1, p.36-41, jan./mar. 2018.

LENZI A., PICARDO M., GANDINI L., DONDERO F. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Human Reproduction Update**, v.2, n.3, p.246-256, 1996.

LIMA J.S., GUAITOLINI C.R.F., CRESPILO A.M., DELL'AQUA C.P.F., MARTINS M.I.M., RIGOTO R.P., MARQUES A.B., HIDALGO M.M.T., MAZIERO R.R.D. Efeito de meios diluidores na congelabilidade do sêmen canino. **Braslian Journal of Development**, Curitiba, v.5, n.9, p.15841-15855, set. 2019.

LÚCIO, C.F. **Efeito da glutathiona reduzida (GSH) na criopreservação de espermatozoides da espécie canina: avaliação in vitro e in vivo**. 2012, 116f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2012.

LUCIO C.F., REGAZZI F.M., SILVA L.C.G., ANGRIMANI D.S.R., NICHI M., VANNUCCHI C.I.. Oxidative stress at different stages of two-step semen cryopreservation procedures in dogs. **Theriogenology**, v.85, n.9, p.156 -1575, June 2016.

LUCIO C.F., BRITO M.M., ANGRIMANI D.S.R., BELAZ K.R.A., MORAIS D., ZAMPIERI D., LOSANO J.D.A., ASSUMPTÇÃO M.E.O.A., NICHI M., EBERLIN M.N., VANNUCCHI C.L. Lipid composition of the canine sperm plasma membrane as markers of sperm motility. **Reproduction in Domestic Animals**, v.52, n.2, p.208-213, 2017.

MACHADO, L.C. **Biologia da reprodução do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e criopreservação do material genético para enriquecimento de banco de gamoplasma animal**. 2016, 100f. . Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2016.

MADEIRA E.M., BIANCHI I., VIEIRA M.B., SCHNEIDER A., SEVERO N.C., PFEIFER L.F.M., CORRÊA M.N.E Avaliação de diferentes crioprotetores intra e extracelulares na criopreservação de sêmen de touros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.2, p.415-420, 2013.

MAHIDDINE F.Y., KIM J.W., QAMAR A.Y., RA J.C., KIM S.H., JUNG E.J., KIM M.J. Conditioned Medium from Canine Amniotic Membrane-Derived Mesenchymal Stem Cells Improved Dog Sperm Post-Thaw Quality-Related Parameters. **Animals**, V.10, 1899, 2020, doi:10.3390/ani10101899

MAHIDDINE F.Y., KIM M. Overview on the Antioxidants, Egg Yolk Alternatives, and Mesenchymal Stem Cells and Derivatives Used in Canine Sperm Cryopreservation. **Animals**, 11, 1930, 2021
<https://doi.org/10.3390/ani11071930>.

MATOS D.L., ARAÚJO A.A., ROBERTO I.G., TONIOLLI R. Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, n.4, p.225-232, out./dez. 2008.

MAZUR P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology - Cell Physiology** Published, v. 247 no. 3, C125-C142, 1 September 1984. Disponível em:
<http://ajpcell.physiology.org/content/247/3/C125.full-text.pdf+html>. Acesso em: 19 nov. 2015.

MOTTA J.P.R., PARAGUASSÚ-BRAGA F.H., BOUZAS L.F., PORTO L.C. Evaluation of intracellular and extracellular trehalose as a cryoprotectant of stem cells obtained from umbilical cord blood. **Cryobiology**, v.68, p.343-348, 2014.

MUKAI C., NELSON J.L., CHEONG S.H., AMORIM M.D., TRAVIS A.J. Impacts of oocyte/zygote timing for in vitro fertilization and gene editing in the dog. **Theriogenology**, v.150, p.347-352, 2020.

NGUYEN V.V., PONCHUNCHOOVONG S., KUPITTAYANANT S., KUPITTAYANANT P. Effects of egg yolk and soybean lecithin on sperm quality determined by computer-assisted sperm analysis and confocal laser scanning microscope in chilled canine sperm. **Veterinary Medicine and Science**, v.5, p.345-360, 2019.

OLIVEIRA G.C., OLIVEIRA, B.M.M, CELEGHINI E.C.C, FERNANDES C.B, MATTOS C.B. Criopreservação do sêmen equino: uma revisão, 2013. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.37, n.1, p.23-28, jan./mar. 2013.

PAUL R.K., KUMAR D., SINGH R. Carboxymethyl cellulose and glycerol act synergistically as cryoprotectant during cryopreservation of ram sêmen. **Cryobiology**, v.101, p.61-66, ago. 2021.

PAPA F.O., FELÍCIO G.B., MELO-OÑA C.M., ALVARENGA M.A., VITA B.D., TRINQUE C., PUOLI-FILHO J.N.P., DELL'AQUA JR J.A. Replacing egg yolk with soybean lecithin in the cryopreservation of stallion semen. **Animal Reproduction Science**. Amsterdam: Elsevier B.V., v.129, n.1-2, p.73-77, 2011.

PEARODWONG P. Comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of boar semen. **Veterinarska Stanica**, v.50, n.6, 2019.

POLGE C., SMITH A.U., PARKES A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v.164, out. 1949

PHEMISTER R.D., HOLST P.A., SPANO J.S., HOPWOOD M.L. Time of ovulation in the beagle bitch. **Biology of Reproduction**, v.8, p.74-82, 1973.

QAMAR, A.Y., FANG, X., KIM, M.J., CHO J. Improved viability and fertility of frozen-thawed dog sperm using adipose-derived mesenchymal stem cells. **Scientific Reports** **10**, 7034 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61803-8>

REED M.L., EZEH P.C.,HAMIC A., THOMPSON D.J., CAPERTON C.L., Soy lecithin replaces egg yolk for cryopreservation of human sperm without adversely affecting postthaw motility, morphology, sperm DNA integrity, or sperm binding to hyaluronate **Fertility and Sterility**, v.92, n.5, nov. 2009.

RODRIGUES, M.P. **Novas percepções sobre o uso de lecitina de soja na criopreservação e fertilidade de espermatozoide bovino**, 2014, f.122. Tese

(Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2014

ROSA A.M. **Uso da sílica coloidal equina no processo de congelação do sêmen canino**. 2018, 53f. Tese (Doutorado) – Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, 2018

SANTOS J.F.P., GOMES E.T., SIQUEIRA A.K.M., CARDOSO R.C.S. Andrologia e criopreservação de sêmen em cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.40, n.4, p.167-179, out/dez 2016.

SHAKOURI N., SOLEIMANZADEH A., RAKHSHANPOUR A., BUCAK M.N. Antioxidant effects of supplementation of 3,4-dihydroxyphenyl glycol on sperm parameters and oxidative markers following cryopreservation in canine semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.56, n.6, 2021.

SHUKLA M.K. **Applied Veterinary Andrology and Frozen Semen Technology**, 1th ed., New India Publishing Agency, India 2020.

SICHERLE C.C, SOUZA F.F, FREITAS-DELLAQUA C.P., MOTHÉ G.B., PADOVANI C.R., PAPA F.O., LOPES M.D. Effects of the cryopreservation process on dog sperm integrity. **Animal Reproduction**, v.17, n.1, 2020.

SIEME H., OLDENHOF H., WOLKERS W.F. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. **Animal Reproduction Science**, v. 169, p. 2-5, 2016.

SIEWERT A., SALVADOR R.A., TIL D., LAMIM T., AMARAL V.L.L. Evaluation of the extracts and plants isolated substances addition with antioxidant potential for cryopreservation of human semen. **Revista de Saúde e Biologia**, v.13, n.2, p.10-19, set/dez 2018.

SILVA A.C.J.S.R. Preservação da fertilidade. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 28, n. 6, p. 365-372, jun. 2006.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M. Criopreservação do sêmen canino: revisão, 2001. **Ciência Rural**, v.11, n.2, p.119-129, 2001.

SILVA L.D.M., LIMA D.B.C. Aspectos da fisiologia reprodutiva da cadela. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.42, n.3-4, p.135-140, jul/dez. 2018.

SILVA S.V.; GUERRA M.M.P. Efeitos de criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.4, p.370-384, out/dez 2011.

SILVA H.V.R., NUNES T.G.P., MOTA FILHO A.C., PINTO J.N., SILVA A.R., SILVA L.D.M. Adição de hidroxitolueno butilado (BHT) no diluidor ACP-106c

para congelação de sêmen canino. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.19, p.1-9, 2018.

SNOECK P.P.N., PESSOA T.H.O., BARROS C.H.S.C., ALLAMAN I.B. Padronização do Sperm Class Analyzer® (SCA®) para avaliação de espermatozoides equinos criopreservados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.72, n.4, p.1163-1171, 2020

SOMI S.S., BINDER C., BURAK J., PAPADOPOULOS N., ILAS J., BOERSMA A., AURICH C. Using egg yolk in a TRIS-Equex STM paste extender for freezing of dog semen is superior to egg yolk plasma, also after addition of lecithin and catalase. **Cryobiology**, v.100, p. 63-71, 2021.

SOUZA E.S.S., ZERVOUDAKIS L.K.H., MOTHEO T.F., SILVA L.E.S., MARINHO A.S. Adição de vitamina E ao meio de criopreservação de sêmen de bovinos pantaneiros. **Investigação**, v.18, n.1, p.45-49, 2019.

SUN L., FAN W., WU C., ZHANG S., DAI J., ZHANG D. Effect of substituting different concentrations of soybean lecithin and egg yolk in tris-based extender on goat semen cryopreservation. **Cryobiology**, v.92, n.1, p.146-150, 2020.

TONIOLLI R.; CANTINHÊDE L.F. Aspectos gerais da criopreservação de sêmen suíno. **Ciência Animal**, v.29, n.1, p.45-62, 2019.

YANG J., XU Y., LUO S., DANG H., CAO M Effect of cryoprotectants on rat kidney decellularization by freeze-thaw process. **Cryobiology**, v. 105, p. 71-82, 2022.

YOSHIDA K., ONO F., CHOUNO T., NAKADA S., IKEGAMI Y., SHIRAKIGAWA N., SAKAI Y., IJIMA H. Creation of a novel lipid-trehalose derivative showing positive interaction with the cell membrane and verification of its cytoprotective effect during cryopreservation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 132, n. 1, p. 81-80, 2021.

CAPITULO 2

ARTIGO

EFEITOS DE DIFERENTES DILUENTES COMERCIAIS PARA CONGELAÇÃO
DE SÊMEN CANINO

Dalmyr Roza Rodrigues^{*a}, Jose Antonio Dell'Aqua Jr^a, Camila de Paula Freitas Dell'Aqua^a, Camila Moreira Trinque^a, Raiza Rocha Pereira^a, Lucas Emanuel Ferreira Canuto^a

^aDepartament of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, FMVZ Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", UNESP, Botucatu, Brazil

*Corresponding author. Tel.: +55 11 9 8669-4756

E-mail Address: dalmyr.rodriques@unesp.br

¹ Artigo redigido segundo as normas da Theriogenology, ISSN 0093-691X, Ranqueada como A1 pelo QUALIS – CAPES de 2019

[Guide for authors - Theriogenology - ISSN 0093-691X \(elsevier.com\)](https://www.elsevier.com/locate/theriogen)

1 Resumo

2

3 O objetivo deste estudo foi comparar e avaliar 3 (três) meios diluentes comerciais
4 para congelação de sêmen canino a base de gema de ovo e lecitina de soja,
5 sobre a qualidade espermática pós-descongelação. Foram utilizados 15 animais
6 de diferentes raças (n=15) entre 2 e 5 anos de idade com fertilidade comprovada,
7 cada ejaculado foi dividido em 3 alíquotas iguais e levados a centrifugação, após
8 a centrifugação de 10 minutos a 600g os pellets foram ressuspensos em cada
9 meio diluente proposto no estudo, 2 a base de gema de ovo (Gema1 e Gema2)
10 e 1 a base de lecitina de soja (Lecitina) na concentração de 100×10^6 de
11 espermatozoides/mL, envazados em palhetas de 0,5mL, submetidos a
12 estabilização a 5°C obedecendo os critérios de cada fabricante e congelados em
13 nitrogênio líquido, a descongelação foi feita a 37°C por 30 segundos. O estudo
14 foi dividido em 2 experimentos, no experimento 1 foram usados 10 animais e foi
15 avaliado os 3 meios diluentes citados e no experimento 2 foram selecionados os
16 dois melhores meios diluentes do experimento 1 para nova avaliação,
17 aumentando o número de amostras em 50% passando para n=15, para diminuir
18 o erro amostral. Os parâmetros avaliados foram a cinética espermática através
19 de análise computadorizada pelo sistema CASA e avaliados quanto a motilidade
20 total (MT), progressiva (MP), espermatozoides com movimento rápido (RAP),
21 velocidade de trajeto (VAP), velocidade curvilinear (VCL) e velocidade linear
22 (VSL), e integridade de membrana plasmática e acrossomal e potencial
23 mitocondrial por citometria de fluxo. No experimento 1 o diluente a base de
24 lecitina de soja mostrou resultados inferiores em comparação com os diluentes
25 a base de gema de ovo para a congelação de espermatozoides caninos com
26 valores de MT de $61.8\% \pm 3.8$, $50.6\% \pm 3.1$, $27.5\% \pm 6.2$, MP de $37.1\% \pm 3.5$,
27 $32.1\% \pm 3.1$, $17.7\% \pm 4.0$ e RAP de $43.7\% \pm 4.4$, $38.2\% \pm 3.8$, $22.6\% \pm 5.4$ para os
28 meios Gema1, Gema2 e Lecitina respectivamente. No experimento 2 a MT foi
29 de $59.9\% \pm 3.3$ e $52.3\% \pm 2.2$, a integridade de membrana foi de $54.5\% \pm 3.3$ e
30 $45.0\% \pm 4.0$ e estabilidade de membrana de $47.6\% \pm 4.5$ e $37.3\% \pm 3.5$ para os
31 meios Gema1, Gema2 respectivamente. Em conclusão com base nos resultados
32 obtidos pode-se afirmar que a lecitina de soja não atingiu resultados satisfatórios
33 para os parâmetros espermáticos avaliados comparados a gema de ovo, e entre

os meios a base de gema de ovo o meio Gema1 apresentou melhores resultados nos parâmetros avaliados pós-descongelação.

1 Introdução

A congelação do sêmen promove queda na qualidade espermática pós-descongelação, além disso, após a colheita, análise, processamento e congelação consegue-se uma pequena quantidade de doses inseminantes por ejaculado do sêmen canino [1]. Para se congelar o sêmen é necessário uma estrutura física e equipamentos específicos, além de profissionais qualificados para manipulação e realização da congelação [2]. O uso de diluentes comerciais específicos para congelação auxiliam os médicos veterinários tornando o processo mais fácil e rápido, e favorecem a ampliação da congelação do sêmen canino.

O uso de sêmen congelado, tanto por criadores como por proprietários comuns vem se tornando uma realidade mundial, favorecendo o intercambio do material genético proporcionando o melhoramento genético das raças, melhorando o bem-estar animal evitando o estresse por deslocamento e diminuindo os custos na criação comercial [1].

Sabendo do potencial da criopreservação do sêmen para manter o material genético disponível por longo período de tempo, tanto de animais de alto valor zootécnico, como de animais ameaçados de extinção [3,4,5,6], existe a necessidade de se aprimorar as técnicas e etapas da congelação e também aprimorar os meios diluentes para melhorar a qualidade espermática pós-descongelação [7].

A escolha do meio diluente é fator primordial e decisivo para se obter resultados mais satisfatórios pós-descongelação [8], e existem algumas substâncias que podem ser utilizadas com efeito crioprotetor que podem melhorar a qualidade do sêmen pós-descongelação [6].

Os crioprotetores são substâncias que proporcionam a diminuição de formação de cristais de gelo na célula espermática diminuindo assim o risco de dano durante a criopreservação diminuindo o risco de lesão, podem ser intra ou extracelulares [9]. O glicerol é o crioprotetor intracelular mais utilizado para

criopreservação de sêmen [9,10] ele atua desidratando a célula retirando água do seu interior diminuindo assim a formação de gelo no interior da célula [9,11] e diminuindo os danos osmóticos [12]. Em relação aos crioprotetores extracelulares podemos destacar a gema de ovo como um dos melhores crioprotetores extracelulares [13] e um dos mais utilizados na espécie canina [14]. A lecitina de soja como é também um crioprotetor extracelular é uma alternativa análoga a gema de ovo [15,16] de origem vegetal, supõe-se que a lecitina de soja reponha os fosfolípidios da membrana plasmática diminuindo as crioinjúrias causadas durante a congelação [17].

Este estudo tem o objetivo de utilizar e avaliar 3 (três) meios diluentes comerciais próprios para congelação de sêmen canino, e analisar qual promove melhor qualidade espermática pós-descongelação.

79

80 2 Materiais e métodos

81

Foram utilizados 15 cães adultos, das raças Pastor Belga Malinois (5), Bernese Mountain Dog (1), Goldem Retriever (3), Dogo Argentino (2), Basset Hound (2), Weimaraner (1), Cocker Spaniel Inglês (1), com idade variando entre 2 e 5 anos, com fertilidade comprovada através de cruzamentos anteriores.

O estudo foi realizado com o objetivo de avaliar 3 meios diluentes comerciais para congelação de sêmen canino em relação a cinética espermática, integridade da membrana plasmática e acrossomal e potencial mitocondrial pós-descongelação das amostras submetidas ao experimento. Foram utilizados os meios diluentes: BotuDog® Freezing (Botupharma®) denominado no estudo de “Gema1”, CaniPlus® Freeze (Minitube®) denominado no estudo de “Gema2”, ambos com gema de ovo, e DC-Crio® (Inprenha® Biotecnologia) denominado no estudo de “Lecitina” com lecitina de soja.

O meio diluente Gema1 e o meio diluente Lecitina são fornecidos pelos fabricantes prontos para o uso, o meio diluente Gema2 precisa ser manipulado antes do uso para que seja adicionado a gema de ovo, a qual foi adicionada gema de ovos orgânicos. Seguindo as orientações especificadas no manual do fabricante, foi separada a gema da clara, em seguida a gema foi colocada em toalha de papel deixando a gema rodar sobre a toalha de papel para remoção

de todo resíduo da clara, em seguida a membrana da gema de ovo foi rompida deixando escorrer somente a gema tomando cuidado para que não fosse adicionado ao meio nenhum fragmento da membrana da gema de ovo, a gema de ovo foi coletada em proveta de vidro graduada esterilizada até a marca de 4 mL, e posteriormente agregada ao meio diluente e homogeneizada cuidadosamente.

O Estudo foi dividido em 2 experimentos, no experimento 1 foram utilizados 10 animais e avaliados os 3 meios diluentes propostos inicialmente (Gema1, Gema2 e Lecitina). No experimento 2, os dois meios diluentes que apresentaram melhores resultados no experimento 1 foram selecionados e submetidos a uma nova avaliação com um acréscimo de 50% das amostras passando para 15 animais diminuindo o erro amostral.

Todo o estudo foi conduzido de acordo com o protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais sob o número 121/2020.

2.1 Colheita das amostras

A colheita do sêmen foi realizada por estimulação digital do pênis com o animal em estação sem a presença de fêmea, mas foi apresentado ao cão um swab com fluido vaginal de fêmea no cio. Todos os cães estavam acompanhados de seus tutores para evitar o estresse na hora da colheita.

A primeira fração da ejaculação foi desprezada e a fração rica em espermatozoides foi coletada em tubo plástico graduado com auxílio de um funil de silicone.

Após a colheita foi realizada a análise macroscópica verificando volume, odor e aspecto do sêmen e logo em seguida encaminhado para o laboratório para análise microscópica e preparo das amostras para realização do estudo.

2.2 Manipulação e preparo das amostras

Após a colheita foi realizada a concentração espermática ($\times 10^6$ espermatozoides/mL) na câmara hematimétrica de Neubauer (Optik Labor, Lancing, Inglaterra), sob microscopia de contraste de fase (Jenamed 2 Zeiss: Carls Zeiss, Munique, Alemanha) em aumento de 400x. O ejaculado foi dividido

em 3 alíquotas iguais para realização do estudo no experimento 1 e em 2 alíquotas iguais para o experimento 2.

2.3 Congelação

O sêmen foi centrifugado por 10 minutos a 600g com rotor móvel, após a centrifugação foi desprezado o sobrenadante. Em seguida cada pellet foi ressuscitado com o respectivo meio diluente utilizado no estudo na concentração de 100×10^6 de espermatozoides/mL e envasados em palhetas de 0,5 mL (IMV® França).

Após o envase as amostras seguiram para estabilização a 5°C que foi realizada em temperatura controlada na geladeira da marca Minitube®, modelo Ref.: 14160/0060. Foi respeitado o protocolo de estabilização de cada fabricante, 2 meios diluentes (Gema1 e Lecitina) foram estabilizados por 1 hora em temperatura controlada de 5°C, enquanto que o terceiro diluente (Gema2) foi mantido por 2 horas em temperatura controlada de 5°C para sua estabilização (Figura 1).

Terminado o período de estabilização à 5°C, todas as amostras foram acondicionadas em caixa isotérmica de 45L preenchida com nitrogênio líquido até a marca de 4 cm de altura. As palhetas foram dispostas horizontalmente a 6,0 cm acima do nível do nitrogênio líquido por 20 minutos, em seguida imersas no mesmo, posteriormente foram transferidas para o botijão de nitrogênio líquido.

2.4 Descongelação

Para a descongelação as palhetas foram retiradas do botijão de nitrogênio líquido direcionadas para o banho-maria e mantidas à 37°C por 30 (trinta) segundos.

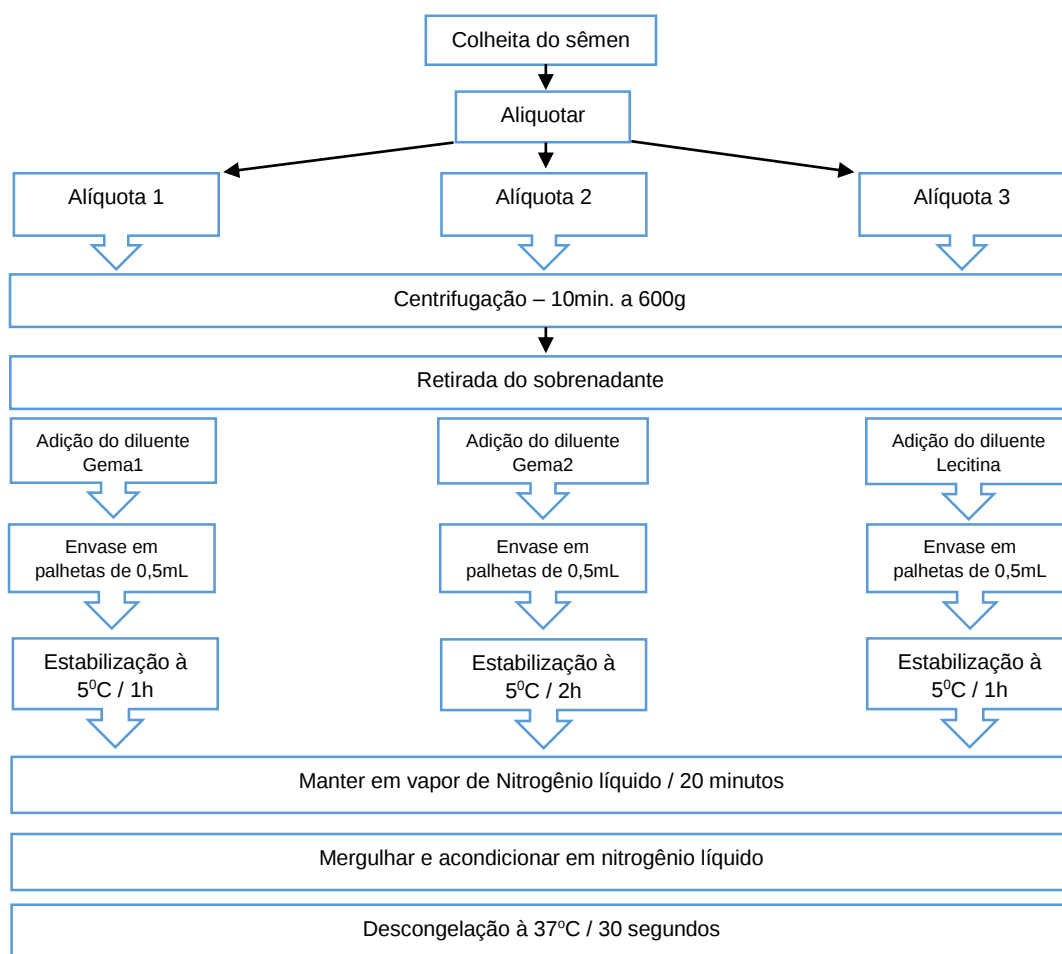


FIGURA 1. Delineamento experimental do processamento das amostras.

2.5 Avaliação espermática pós-descongelamento

Após a descongelamento das palhetas, os espermatozoides foram avaliados quanto a integridade de membrana e potencial mitocondrial no citometro de fluxo e quanto a cinética espermática no CASA.

2.5.1 Avaliação da cinética espermática

As análises foram efetuadas 5 minutos após a descongelamento a 37°C por 30 segundos.

Foi utilizado o equipamento CASA (Hamilton Thome Research – IVOS 12, Beverly, MA, USA). Uma alíquota de 10 µL (microlitros) foi colocada na câmara de Makler pré-aquecida a 38°C para avaliação de 5 campos aleatórios com número mínimo de 200 espermatozoides por campo.

A avaliação realizada foi da motilidade espermática total (MT), motilidade espermática progressiva (MP), porcentagem de espermatozoides com movimento rápido (RAP), velocidade do trajeto (VAP), velocidade linear (VSL) e velocidade curvilínea (VCL). A configuração utilizada no CASA dos parâmetros avaliados para espécie canina estão disponíveis na Tabela 1.

TABELA 1 – Configuração do CASA para análise de sêmen de cães

Parâmetro	Configuração
Frames / s	60 Hz
Nº of frames	30
Minimum contrast	30
Minimum cell size	5 pix
Cell size	4 pix
Cell intensity	40
Path velocity (VAP)	70.0 μ /s
Straightness (STR)	80.0 %
VAP cutoff	30.0 μ /s
VSL cutoff	20.0 μ /s
Temperature	38°C
Chamber model	Makler*

*Makler Counting Chamber, Lexington – KY – USA

2.5.2 Avaliação das alterações de membrana plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial

Para avaliação de alterações na membrana plasmática e acrossomal e potencial mitocondrial foi utilizado o equipamento BD LSR Fortessa (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipado com lasers: azul 488-nm, 100 mW, vermelho 640-nm, 40mW e violeta 405-nm, 100mW. As mensurações de fluorescência foram realizadas nos filtros 450/50 nm (H342), 530/30 nm (FITC); 660/20 nm (APC); and 694/50 nm (PI). Auto fluorescência e controles de cada fluorocromo foram adquiridos para ajuste de sobreposição de onda e compensação utilizando-se a matriz de compensação do próprio software. Os

dados foram gerados utilizando-se gráficos dotplot incluindo eixo bi-exponencial tornando todos os eventos visíveis e propriamente compensados.

No mínimo 10.000 células por amostra foram analisadas e os dados foram avaliados pelo software BD FACSDiva™ software v 6.1. As amostras foram diluídas em TALP-PVA (Parrish [18] modificado pela adição de álcool polivinil:100mM NaCl, 3,1mM KCl, 25,0mM NaHCO₃, 0,3mM NaH₂PO₄, 21,6mM DL-lactato de sódio 60%,2,0mM CaCl₂, 0,4mM MgCl₂, 10,0mM Hepes-livre de ácido, 1,0mM piruvato de sódio, 1,0mg/mL álcool polivinil-PVA e 25µg/mL gentamicina) na concentração de 5x10⁶ espermatozoides/mL e acrescido de 7µM Hoechst 33342 (14533, Sigma Chemical Company) para eliminação dos debris.

2.5.3 Integridade de membrana espermática e acrossomal

Foi utilizado de iodeto de propídio (P4170; Sigms Chemical Company) e FITC-PSA (aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocianato de fluoresceína; L0770, Sigma Chemical Company) de acordo com Freitas-Dell'Aqua [19]. Resumidamente, em 500µL da solução diluído em TALP-PVA foi adicionada 1,5 µM de PI, 2ng de FITC-PSA, incubada durante 20 minutos à 37°C ao abrigo da luz. Ao término deste período, as amostras foram avaliadas no citometro de fluxo. Foram avaliadas e classificadas em 4 (quatro) categorias: membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra (MPLAI); membrana plasmática e acrossomal lesadas (MPAL); membrana plasmática e acrossomal íntegras (MPAI); e membrana plasmática íntegra e acrossomal lesada (MPIAL). Para a análise da qualidade e integridade de membrana espermática e acrossomal foram utilizados apenas os espermatozoides da categoria MPAI (Figura2).

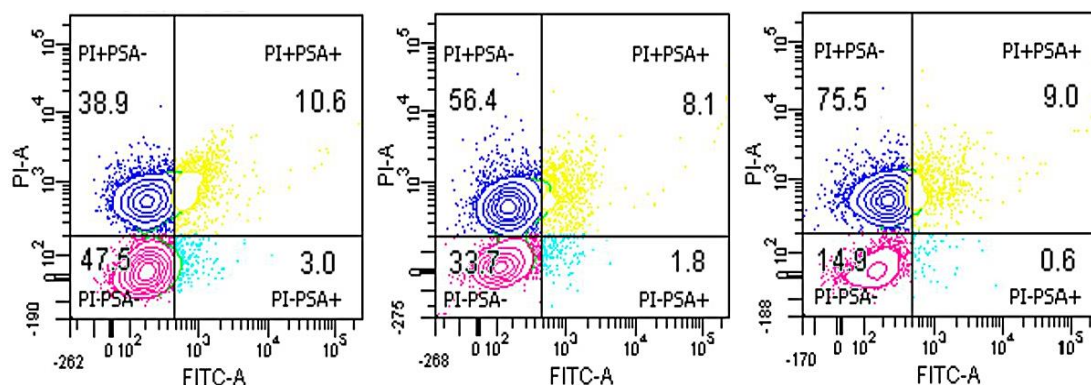


FIGURA 2 – Gráficos contour-plot representativos da análise das membranas plasmática e acrossomal realizada após descongelação do sêmen de cães congelados com diferentes meios de congelação, respectivamente Gema1, Gema2 e Lecitina, avaliados por citometria de fluxo (BD LSR Fortessa) com a associação das sondas iodeto de propídio (para lesão de membrana plasmática; PI+) e FITC-PSA (para lesão de membrana acrossomal; PSA+), sendo então dividido em 4 populações: PI+PSA- (membrana plasmática lesada e acrossomal integra); PI+PSA+ (membrana plasmática e acrossomal lesadas); PI-PSA- (membrana plasmática e acrossomal integras) e PI-PSA+ (membrana plasmática integra e acrossomal lesada). Para a análise da qualidade espermática pós descongelação utilizou-se apenas a população PI-PSA-.

2.5.4 Fluidez de membrana

Para a avaliação das mudanças na fluidez da membrana plasmática foi utilizado a combinação de sondas fluorescentes de merocianina 540 (M540; M24571; Invitrogen, Molecular Probes) Yo-Pro 1 (YP; Y3603, Life Technologies). Assim em 200µL de sêmen diluído em TALP-PVA foi acrescido 7.5mM de M540 e 25nM de YP e incubado à 37°C ao abrigo da luz por 20 (vinte) minutos. Para a análise da qualidade e estabilidade de membrana espermática foram utilizados apenas as células espermáticas negativas para YP e M540, isto é, as células que não apresentaram danos a membrana espermática (Figura 3).

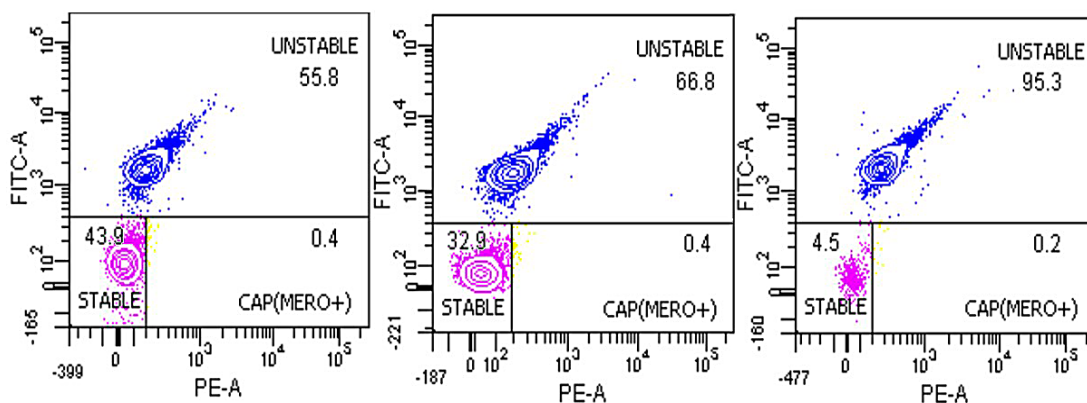


FIGURA 3 - – Gráficos contour-plot representativos da análise da estabilidade de membrana plasmática realizada após descongelação do sêmen de cães congelados com diferentes meios de congelação, respectivamente Gema1, Gema2 e Lecitina, avaliados por citometria de fluxo (BD LSR Fortessa) com a associação das sondas Yopro (unstable; células com desestabilização de membrana) e merocianina (cap/mero+; células com criocapacitação). Para a análise da qualidade espermática utilizou-se apenas as células que negativas tanto para Yopro quanto para Merocianina, sendo assim as células sem nenhum dano a membrana plasmática.

2.5.5 Potencial mitocondrial

Para avaliação do potencial mitocondrial foi utilizada a associação de Yopro (YP; marcação para célula com membrana plasmática desestabilizada, Y3603, Life Technologies) e MitoStatus Red (MST; potencial mitocondrial, BD Pharmigen) (Figura 4). Assim em uma amostra de 500µL de sêmen diluído foi adicionado 25nM YP, 20µM de MST incubada a 37°C por 20 minutos.

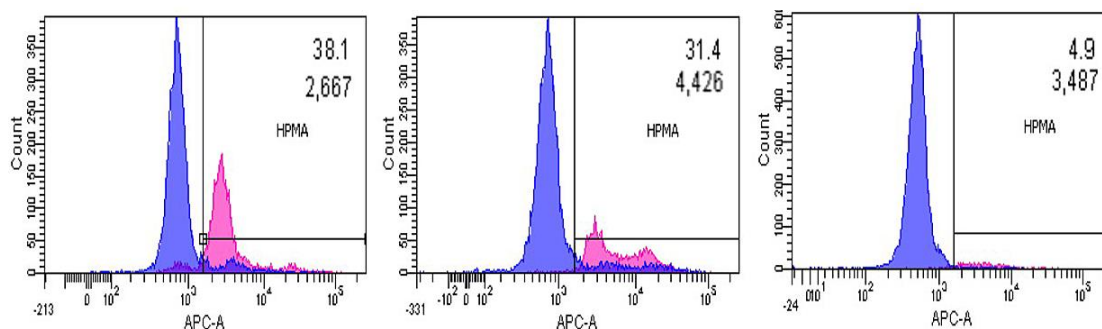


FIGURA 4 – Histogramas representativos da análise de potencial mitocondrial realizada após descongelação do sêmen de cães congelados com diferentes meios de congelação, respectivamente Gema1, Gema2 e Lecitina, avaliados por citometria de fluxo (BD LSR Fortessa) com a associação das sondas YoPro (células positivas pra Yopro são representadas em azul, consideradas com membrana plasmática

desestabilizada e células negativas em rosa, consideradas células com membrana plasmática estável) e MitoStatus Red para potencial mitocondrial. A análise realizada foi quantitativa representada (38,1; 31,4 e 4,9, respectivamente) em % e qualitativa representada (2667, 4426 e 3487, respectivamente) em UA (unidade arbitrária; que representa a intensidade de fluorescência da sonda MST).

2.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo Programa GraphPad Prism versão 6.0 para Windows (GraphPad software, LA Jolla, Califórnia, USA; www.graphpad.com). Os resultados foram expressos em média e erro padrão, foram avaliados quanto sua distribuição pelo teste Kolmogorov-Smirnov e quando apresentavam distribuição normal (dados paramétricos) foram submetidos à análise de variância de medidas repetidas (ANOVA), seguido de teste de Tukey, quando não apresentavam distribuição normal (dados não paramétricos) foram submetidos ao teste de Friedman seguido de Dunn para determinar diferenças significativas em todas as variáveis entre grupos, com nível de significância $P < 0,05$.

3 Resultados

Os resultados obtidos foram separados por experimento, isto é, experimento 1 e experimento 2.

3.1 Experimento 1

Os resultados obtidos na avaliação da cinética espermática mostram uma superioridade na qualidade espermática pós-descongelção dos meios a base de gema de ovo (Gema1 e Gema2) em comparação ao meio a base de lecitina de soja (Lecitina). Os meios a base de gema de ovo apresentaram motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e espermatozoides com movimento rápido (RAP), significativamente superior ao meio a base de lecitina de soja (Tabela 2). Entre os meios a base de gema de ovo o meio diluente Gema1 apresentou MT bem acima da média dos demais meios e manteve valores

superiores de MP e RAP, mas sem diferença estatística em relação ao meio Gema2, além de apresentarem valor menor para velocidade curvilinear (VCL) representando uma menor oscilação de trajeto do espermatozoide, já que os meios não apresentaram diferença estatística para velocidade linear (VSL). O meio diluente Gema2 não apresentou diferença estatística em relação aos outros dois meios para o parâmetro de velocidade do trajeto (VAP), porém o meio Gema1 apresentou diferença significativa em relação ao meio Lecitina para este parâmetro. O meio a base de lecitina de soja (Lecitina) apresentou MT, MP e RAP significativamente abaixo da média, além de apresentar VCL muito superior à média, representando uma grande oscilação na trajetória do espermatozoide (Tabela 2).

TABELA 2 – Média $\pm$ erro padrão da média da avaliação computadorizada do movimento espermático realizado pelo CASA (Hamilton Thorne Research, IVOS 12) da análise de sêmen descongelado de 10 cães, congelados com 3 diferentes meios de congelação (Gema1, Gema2 e Lecitina)

	Gema1	Gema2	Lecitina
MT (%)	61.8 $\pm$ 3.8 ^a	50.6 $\pm$ 3.1 ^b	27.5 $\pm$ 6.2 ^c
MP (%)	37.1 $\pm$ 3.5 ^a	32.1 $\pm$ 3.1 ^a	17.7 $\pm$ 4.0 ^b
RAP (%)	43.7 $\pm$ 4.4 ^a	38.2 $\pm$ 3.8 ^a	22.6 $\pm$ 5.4 ^b
VAP (μ m/s)	83.8 $\pm$ 2.6 ^b	88.5 $\pm$ 3.1 ^{ab}	96.2 $\pm$ 3.2 ^a
VSL (μ m/s)	75.2 $\pm$ 2.6	78.3 $\pm$ 2.9	82.2 $\pm$ 3.6
VCL (μ m/s)	114.4 $\pm$ 3.8 ^b	125.0 $\pm$ 5.6 ^b	158.8 $\pm$ 3.0 ^a

*Valores com sobrescritos diferentes ^{a,b,c} na mesma linha diferem significativamente (P<0.05). MT: motilidade espermática total; MP: motilidade espermática progressiva; RAP: espermatozoides com movimento rápido; VAP: velocidade do trajeto; VSL: velocidade linear; VCL: velocidade curvilinear.

Os resultados obtidos na avaliação por citometria de fluxo mostraram diferença significativa nos 3 meios em relação a integridade de membrana plasmática e acrossomal, sendo que o grupo Gema1 apresentou resultado superior em relação aos outros dois meios. Os meios a base de gema de ovo Gema1 e Gema2 apresentaram superioridade sobre o grupo Lecitina tanto para estabilidade de membrana quanto para alto potencial mitocondrial. O meio

Gema2 apresentou resultado significativamente melhor para potencial mitocondrial em relação aos demais meios que não apresentaram diferença estatística entre eles (Tabela 3).

TABELA 3 - Média $\pm$ erro padrão da média da avaliação por citometria de fluxo (BD LSR Fortessa) da análise de sêmen descongelado de 10 ejaculados de cães, congelados com 3 diferentes meios de congelação (Gema1, Gema2 e Lecitina).

	Gema1	Gema2	Lecitina
Integridade de membrana plasmática e acrossomal (%)	54.5 $\pm$ 4.6 ^a	42.1 $\pm$ 5.0 ^b	19.2 $\pm$ 5.7 ^c
Estabilidade de membrana plasmática (%)	42.8 $\pm$ 6.1 ^a	33.13 $\pm$ 3.4 ^a	14.3 $\pm$ 3.5 ^b
Alto potencial mitocondrial (%)	36.4 $\pm$ 8.4 ^a	39.7 $\pm$ 3.3 ^a	16.8 $\pm$ 4.5 ^b
Potencial Mitocondrial (AU)	3669 $\pm$ 999.2 ^b	7343 $\pm$ 832.5 ^a	4098 $\pm$ 549 ^b

*Valores com sobrescritos diferentes ^{a,b,c} na mesma linha diferem significativamente (P<0.05).

3.2 Experimento 2

Conforme mencionado anteriormente o experimento 2 foi realizado com os 2 meios diluentes que apresentaram os melhores resultados no experimento 1. Os meios diluentes a base de gema de ovo foram os que apresentaram melhores resultados no experimento1, e assim selecionados para serem avaliados no experimento 2.

Os resultados em relação a cinética espermática mostraram uma vantagem para o meio Gema1 sobre a MT ao qual teve desempenho superior significativo, e apesar de apresentar melhores resultados para MP e RAP não foi observado diferença estatística entre eles. O meio Gema2 apresentou valor maior para VAP, tal valor pode ser justificado pelo maior valor de VCL apresentado por ele também. Para os parâmetros de MP, RAP e VSL os dois meios não apresentaram diferença estatística entre eles. Para o parâmetro VCL o meio Gema1 apresentou menor valor (Tabela 4), o que significa uma menor variação na trajetória do espermatozoide, isto é, uma trajetória mais linear.

386 TABELA 4 – Média $\pm$ erro padrão da média da avaliação computadorizada do
 387 movimento espermática realizado pelo CASA (Hamilton Thorne Research, IVOS 12) da
 388 análise de sêmen descongelado de 15 ejaculados de cães, congelados com 2 diferentes
 389 meios diluentes de congelação (Gema1 e Gema2)

	Gema1	Gema2
MT (%)	59.9 $\pm$ 3.3 ^a	52.3 $\pm$ 2.2 ^b
MP (%)	35.5 $\pm$ 3.2	32.7 $\pm$ 2.3
RAP (%)	41.3 $\pm$ 3.8	40.1 $\pm$ 2.7
VAP (μ m/s)	82.7 $\pm$ 2.1 ^b	90.1 $\pm$ 2.3 ^a
VSL (μ m/s)	74.4 $\pm$ 2.1	78.8 $\pm$ 2.2
VCL (μ m/s)	112.8 $\pm$ 2.8 ^b	128.0 $\pm$ 4.4 ^a

390 *Valores com sobrescritos diferentes ^{a,b} na mesma linha diferem significativamente
 391 (P<0.05). MT: motilidade espermática total; MP: motilidade espermática progressiva;
 392 RAP: espermatozoides com movimento rápido; VAP: velocidade do trajeto; VSL:
 393 velocidade linear; VCL: velocidade curvilínea.

394

395 Os resultados obtidos na avaliação por citometria de fluxo mostraram
 396 diferença significativa em relação a integridade de membrana plasmática e
 397 acrossomal, e para estabilidade de membrana plasmática, sendo que o meio
 398 Gema1 apresentou melhores resultados em relação ao meio Gema2. O meio
 399 Gema2 apresentou melhor resultado para potencial mitocondrial. Para alto
 400 potencial mitocondrial não foi observada diferença entre os meios Gema1 e
 401 Gema2 (Tabela 5).

402

403 TABELA 5 - Média $\pm$ erro padrão da média da avaliação por citometria de fluxo (BD
 404 LSR Fortessa) da análise de sêmen descongelado de 15 ejaculados de cães,
 405 congelados com 2 diferentes meios diluentes de congelação (Gema1 e Gema2)

	Gema1	Gema2
Integridade de membrana plasmática e acrossomal (%)	54.5 $\pm$ 3.3 ^a	45.0 $\pm$ 4.0 ^b
Estabilidade de membrana plasmática (%)	47.6 $\pm$ 4.5 ^a	37.3 $\pm$ 3.5 ^b
Alto potencial mitocondrial (%)	43.0 $\pm$ 6.5	52.8 $\pm$ 3.1
Potencial Mitocondrial (AU)	4417 $\pm$ 824.6 ^b	7546 $\pm$ 795.9 ^a

406 *Valores com sobrescritos diferentes ^{a,b} na mesma linha diferem significativamente
 407 (P<0.05).

408 4 Discussão

409

410 Neste estudo foram comparados 3 meios diluentes comerciais próprios
411 para congelação de sêmen canino, sendo 2 a base de gema de ovo e 1 a base
412 de lecitina de soja, sobre a qualidade espermática pós-descongelação. De
413 acordo com as avaliações dos resultados obtidos, ambos os meios contendo
414 gema de ovo apresentaram melhores resultados tanto para cinética espermática,
415 quanto para análise morfofuncional por citometria de fluxo em relação ao meio
416 contendo lecitina de soja. Esses resultados corroboram com estudos anteriores
417 quando a gema de ovo apresentou resultados superiores em relação a lecitina
418 de soja para MT [13], MP [13, 20], além de integridade de membrana [13,20,21],
419 acrossoma integro [19,20].

420 Para a melhor proteção oferecida ao espermatozoide pelos meios
421 contendo gema de ovo podemos levantar a hipótese de que a gema de ovo
422 contém lipídios 12,14% e proteínas 11,15% em sua composição [22] e a lecitina
423 de soja praticamente só lipídios [23], a lecitina contém entre 19% e 21% de
424 fosfatidilcolina em sua composição [24]. As proteínas promovem melhor
425 interação entre as lipoproteínas de baixa densidade da gema de ovo com a
426 membrana espermática [25, 26], fato relatado em estudo com sêmen de touro
427 no qual a adição de proteína ao meio a base de lecitina de soja aumentou a
428 viabilidade espermática em 25% [27].

429 A motilidade espermática está relacionada com a composição lipídica da
430 membrana plasmática, os ácidos graxos insaturados melhoram a elasticidade da
431 membrana plasmática proporcionando maior fluidez, mas aumentam a ação de
432 radicais livres, isto é, aumentam a peroxidação lipídica [28]. A lecitina de soja
433 contém 40,73% de ácidos graxos insaturados [29] em sua composição, o que
434 pode contribuir para causar maior dano a membrana do espermatozoide quando
435 se utiliza a lecitina de soja. Ao contrário dos resultados obtidos neste estudo e
436 em estudos anteriores [13,20,21] Dalmazzo *et al.* [30] sugerem que a lecitina
437 pode ser uma alternativa viável a gema de ovo na espécie canina. Estudos
438 realizados em outras espécies [31, 32, 33, 34] também concluíram que a lecitina
439 de soja não promove proteção ao espermatozoide na congelação.

Entre os meios diluentes para congelação a base de gema de ovo, o meio Gema1 apresentou resultado mais eficaz na proteção das células espermáticas pós-descongelação em comparação com o meio Gema2 de acordo com o que observamos nos parâmetros de MT, integridade de membrana plasmática e acrossomal e estabilidade de membrana plasmática. A hipótese que pode explicar estes resultados é o tempo de estabilização à 5°C em que os meios foram submetidos, as palhetas chegam a temperatura de 5°C de 8 a 10 minutos após serem colocadas na geladeira de estabilização [35] utilizada neste estudo e assim permaneceram até completar 1 hora para o meio Gema1 e até completar 2 horas para o meio Gema2. O tempo de equilíbrio é muito variável na espécie canina entre os autores, de 1 a 4 horas [36], 3 horas [37] e até 48 horas [38], porém a maioria dos estudos relatam o tempo de equilíbrio de 1 hora [39,40,41]. Na espécie equina o tempo de equilíbrio longo não promoveu melhora na MT dos espermatozoides congelados [42]. Santos *et al.* [43] compararam a congelação de sêmen canino com diferentes tempos de equilíbrio (1h, 2h, 3h, 4h) e os melhores resultados foram para o sêmen mantido por 1 hora para equilíbrio pré-congelação.

Esta hipótese pode ser sustentada devido ao tempo de ação do meio diluente para congelação com o espermatozoide, já que o meio diluente de congelação contém glicerol e este sendo tóxico a célula espermática pode promover efeito deletério ao espermatozoide, sendo assim, a diminuição no tempo de ação do glicerol com o espermatozoide pode diminuir o efeito tóxico sobre o mesmo [44]. Outro fato relacionado a toxicidade do glicerol é que pode promover uma alteração nas proteínas da membrana [45]

O meio diluente Gema2 apresentou melhor resultado para o parâmetro de potencial mitocondrial em comparação ao meio Gema1, com relação à avaliação do alto potencial mitocondrial não foi observada diferença entre os meios. Apesar da motilidade espermática estar relacionada com o potencial mitocondrial [46] no presente estudo o meio que apresentou melhor potencial mitocondrial apresentou menor percentual de motilidade.

O aumento da atividade mitocondrial pode estar relacionado com o processo de pré capacitação. O processo de capacitação espermática é caracterizado inicialmente por um aumento da permeabilidade da membrana, com isso ocorre um influxo de cálcio [47], ocorrendo a hiperativação quando há

aumento da atividade mitocondrial. A hiperativação promove aumento no movimento flagelar, aumento no deslocamento lateral da cabeça e aumento da velocidade curvilínea (VCL) [48,49] o que justifica o maior valor de VCL e maior valor de VAP apresentado pelo meio Gema2, sendo que o valor de VSL não diferiu entre os meios.

Na capacitação ocorre a reorganização das proteínas integrantes da membrana alterando e aumentando a fluidez da membrana espermática [50,51], o Yo-Pro não penetra em células integras, mas devido a alterações na permeabilidade da membrana ele é capaz de penetrar [52] sendo possível identificar alterações de permeabilidade da membrana espermática [53], a associação de M540-YP pode indicar espermatozoides viáveis com membranas desestabilizadas, sendo um marcador para indicar precocemente a capacitação espermática na espécie canina [54]. Dados que corroboram com os resultados apresentados neste estudo, em que o alto valor para potencial mitocondrial apresentado pelo meio Gema2, associado ao baixo percentual de membrana acrossomal e alto valor de VCL podem ser indicativo de capacitação precoce, porém mais estudos são necessários para comprovar esta hipótese.

5 Conclusão

Baseado nos resultados obtidos pode-se concluir que o meio diluente para congelamento de sêmen canino "Lecitina" a base de lecitina de soja apresentou resultados inferiores para os parâmetros espermáticos avaliados pós-descongelamento em comparação com os meios a base de gema de ovo que proporcionaram uma melhor proteção a célula espermática. Sendo que, entre os meios diluentes a base de gema de ovo o meio diluente Gema1 apresentou melhores resultados para os parâmetros de motilidade total, integridade de membrana plasmática e acrossomal, e estabilidade de membrana pós-descongelamento.

Referências

- [1] Lechner D, Aurich J, Schäfer-Somi S, Herbel J, Aurich C. Combined cryopreservation of canine ejaculates collected at a one-hour interval increases semen doses for artificial insemination without negative effects on post-thaw sperm characteristics. *Reproduction in Domestic Animals*. 2021; 56: 1220-26.
- [2] Ubah S.A, Sule M, Chibuogwu I.C, Columbus P.K, Abah K.O, Agbonu O.A, Ejiofor C.E, Mshelbwala P.P, Bankole S.A. Comparative study of chicken egg yolk and quail egg yolk in two chilled canine semen extenders. *Sokoto Journal of Veterinary Science*. 2019; 17(4): 62-69.
- [3] Sicherle C.C, Souza F.F, Freitas-Dellaqua C.P., Mothé G.B., Padovani C.R., Papa F.O., Lopes M.D. Effects of the cryopreservation process on dog sperm integrity. *Animal Reproduction*. 2020; 17(1):e20190081.
<https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0081>
- [4] Andrae C.S., Oliveira E.C.S., Ferraz M.A.M.M., Nagashima J.B. Cryopreservation of grey wolf (*Canis lupus*) testicular tissue. *Cryobiology*. 2021; 100: 173-79.
- [5] Usuga A, Tejera I, Gómez J, Restrepo O, Rojano B, Restrepo G. Cryoprotective effects of ergothioneine and isoespintanol on canine semen. *Animals*. 2021; 11, 2757. <https://doi.org/10.3390/ani11102757>
- [6] Kim E., Almubarak A., Talha N., YU I., Jeon Y. The Use of α -Carrageenan in Egg Yolk Free Extender Improves the Efficiency of Canine Semen Cryopreservation. *Animals*. 2021, 12(1): 88.<https://doi.org/10.3390/ani12010088>
- [7] Kawasaki Y., Sakurai D., Yoshihara T., Tsuchida M., Harakawa S., Suzuki H. Effect of quercetin on the motility of cryopreserved canine spermatozoa. *Cryobiology*. 2020 out; 96: 50-54.
- [8] Silva H.V.R., Nunes T.G.P., Mota Filho A.C., Pinto J.N., Silva A.R., Silva L.D.M. Adição de hidroxitolueno butilado (BHT) no diluidor ACP-106c para congelação de sêmen canino. *Ciência Animal Brasileira*. 2018, Goiânia; 19:1-9.
- [9] Paul R.K., Kumar D., Singh R. Carboxymethyl cellulose and glycerol act synergistically as cryoprotectant during cryopreservation of ram semen. *Cryobiology*. 2021 ago; 101: 61-66.
- [10] Menezes GFO, Bittencourt RF, Ribeiro Filho AL, Cardoso FL, Silva MAA, Santos ES. Dimetilacetamida associada ou não ao glicerol para criopreservação de sêmen ovino. *Ciência Animal Brasileira*, 2018; 19: 1-10.

- [11] Lenz D.R., Lima M.C.C., Prado T.F., Victorio A.M., Paula F.G., Meirinhos M.L.G., Arnhold E. Avaliação de diferentes crioprotetores em tempos de descongelamento de sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum*. Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte. 2018; 42(1): 36-41, jan./mar.
- [12] Mahiddine F.Y, Kim J.W, Qamar A.Y, RA J.C, Kim S.H, Jung E.J, Kim M.J Conditioned Medium from Canine Amniotic Membrane-Derived Mesenchymal Stem Cells Improved Dog Sperm Post-Thaw Quality-Related Parameters. Animals. 2020; 10: 1899, doi:10.3390/ani10101899
- [13] Somi S.S., Binder C., Burak J., Papadopoulos N., Ilas J., Boersma A., Aurich C. Using egg yolk in a TRIS-Equex STM paste extender for freezing of dog semen is superior to egg yolk plasma, also after addition of lecithin and catalase. Cryobiology. 2021; 100: 63-71.
- [14] Mahiddine F.Y., Kim M. Overview on the Antioxidants, Egg Yolk Alternatives, and Mesenchymal Stem Cells and Derivatives Used in Canine Sperm Cryopreservation. Animals. 2021; 11: 1930 <https://doi.org/10.3390/ani11071930>.
- [15] Reed M.L., Ezech P.C., Hamic A., Thompson D.J., Caperton C.L., Soy lecithin replaces egg yolk for cryopreservation of human sperm without adversely affecting postthaw motility, morphology, sperm DNA integrity, or sperm binding to hyaluronate. Fertility and Sterility. 2009 nov; 92(5).
- [16] Wojtusik J, Stoops M.A, Roth TL. Comparison of soy lecithin, coconut water, and coconut milk as substitutes for egg-yolk in semen cryodiluent for black rhinoceros (*Diceros bicornis*) and Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*). Theriogenology. 2018; 121: 72-77.
- [17] Mehdipour M, Kia HD, Moghaddam G, Hamishehkar H. Effect of egg yolk plasma and soybean lecithin on rooster frozen-thawed sperm quality and fertility. Theriogenology. 2018; 116: 89-94.
- [18] Parrish J.J, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. Capacitation of Bovine Sperm by Heparin. Biology of Reproduction. 1988 jun; 38(5): 1171-80, <https://doi.org/10.1095/biolreprod38.5.1171>
- [19] Freitas-Dell'aqua C.P, Guasti PN, Monteiro GA, Maziero RRD, Dell'Aqua Jr JA, Papa FO. Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen stallion spermatozoa. Animal Reproduction. 2012; 9: 941.
- [20] Axné E, Lagerson E. Cryopreservation of dog semen in a tris extender with 1% or 2% soya bean lecithin as a replacement of egg yolk. Reproduction in Domestic Animals, 2016; 51: 262-68.

- [21] Hermansson U, Johannisson A, Axnér E. Cryopreservation of dog semen in a Tris extender with two different 1% soybean preparations compared with a Tris egg yolk extender. *Vet Med Sci*. 2021; 00: 1-8.
<https://doi.org/10.1002/vms3.445>
- [22] Melo AS, Fernandes RTV, Oliveira VRM, Queiroz JPAF, Dias FKD, Souza RF, Marinho JBM, Souza AOV, Santos Filho CA. Características físico-químicas e sensoriais de aves e ovos. *Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2015 dez, Maringá; 9(12): 536-43.
- [23] Nguyen V.V., Ponchunchoovong S., Kupittayanant S., Kupittayanant P. Effects of egg yolk and soybean lecithin on sperm quality determined by computer-assisted sperm analysis and confocal laser scanning microscope in chilled canine sperm. *Veterinary Medicine and Science*. 2019; 5: 345-60.
- [24] Scholfield C.R. Composition of soybean lecithin. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 1981; 58(10): 889-92.
- [25] Watson PF, The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. *Journals of Reproduction and Fertility*, 1981; 62: 483-92.
- [26] Belala R, Delay J, Amirat L, Ropers MH, Guillou JL, Anton M, Schmitt E, Thorin C, Michaud S, Kaidi R, Tainturier D, Bencharif D. The benefits of liposomes for chilling canine sperm for 4 days at 4°C. *Animal Reproduction Science*, 2016; 168: 100-9.
- [27] Yáñez-Ortiz I, Catalán J, Rodríguez-Gil JE, Miró J, Yeste M. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Animal Reproduction Science*. 2021; <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106904>
- [28] Lucio CF, Brito MM, Angrimani DSR, Belaz KRA, Moraes D, Zampieri D, Losano JDA, Assumpção MEOA, Nichi M, Eberlin MN, Vannucchi CI. Lipid composition of the canine sperm plasma membrane as markers of sperm motility. *Reproduction in Domestic Animals*. 2017; 52 (2): 208-13.
- [29] Castejon LV. Parâmetros de qualidade na clarificação da lecitina de soja. 2015, Tese (Doutorado): 188. Universidade Federal de Uberlândia
- [30] Dalmazzo A., Losano J.D.A., Rocha C.C., Tsunoda R.H., Angrimani D.S.R., Mendes C.M., Assumpção M.E.O.D., Nichi M., Barnabe V.H. Effects of soy lecithin extender on dog sperm cryopreservation. *Animal Biotechnology*, 2018; 29(3): 174-82, b. Doi: 10.1080/10495398.2017.1334662
- [31] Crespilho AM, Sá Filho MF, Dell'Aqua Jr JÁ, Nichi M, Monteiro GA, Avanzi BR, Martins A, Papa FO. Comparison of *in vitro* and *in vivo* fertilizing

potential of bovine sêmen frozen in egg yolk or new lecithin based extenders. *Livestock Science*. 2012; 149: 1-6.

[32] Tabarez A, García W, Palomo MJ. Soy lecithin as a potential alternative to powdered egg yolk for buck sperm cryopreservstion does not protect then from mitochondrial damage. 2020; 217:

[33] Nadri T, Towhidi A, Zeinoaldini S, Martínez-Pastor F, Mousavi M, Noei R, Tar M, Mohammadi Sangcheshmeh A. Letithin nanoparticles enhance the cryosurvival of canine sperm. *Theriogenology*. 2019; 133: 38-44.

[34] Pearodwong P. Comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of boar semen. *Veterinarska Stanica*. 2019; 50(6).

[35] Dias EAR. Avaliação de Sistema de refrigeração e congelação na cinética e função espermática do sêmen bovino. 2016: 69; Dissertação (Mestrado) – Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, 2016.

[36] Santos JFP, Gomes ET, Siqueira AKM, Cardoso RCS. Andrologia e criopreservação de sêmen em cães. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 2016 out/dez; 40(4): 167-79.

[37] Puja K, Sawitri NM, Maharani N, Heryani LGSS, Dharmayudha AAGO, Gunawan WNF. Preservation of semen from Kintamani Bali dogs by freezing method. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*. 2019; 6(2): 158-62.

[38] Santana M, Batista M, Alamo D, González F, Niño T, Cabrera F, Gracia A. Influence of cool storage before freezing on the quality of frozen-thawed sêmen samples in dogs. *Reproduction in Domestic Animals*, 2013; 48: 165-70.

[39] Silva A. Atualidades sobre a criopreservação do sêmen de cães. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 2007 jan/mar; 31(1): 119-27.

[40] Chirinéa VH, Inseminação Artificial com Sêmen Congelado em Cães. 2008: 86; Tese (Doutorado) – UNESP – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2008.

[41] Neves MM, Henry M, Clemente CAA, Heneine LGD. Padronização de uma técnica de congelamento de sêmen em cães. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2009; 37(3): 259-63.

[42] Fürst R. Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas na fertilidade do sêmen equino. 2006: 114; Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, 2006.

- [43] Santos I.W, Lima V.F.M.H, Binsfeld L.C, Ribeiro A.P.C. Freezing of canine semen comparing different glycerol concentrations and cooling-off periods. Archives of Veterinary Science, 2003; 8(2): 57-62.
- [44] Oliveira FJG, Pinho RO, Martins LF, Borges MCB, Carvalho GR, Guimarães JD. Effect of glycerol addition in diferente cooling periods on the freezability of equine sêmen. Revista Científica de Medicina Veterinária, 2017 jun; XIV(29)
- [45] Hammerstedt R.H, Graham J.K. Cryopreservation of Poultry Sperm: The Enigma of Glycerol. Cryobiology, 1992; 29: 26-38.
- [46] Troiano L, Granata ARM, Cossarizza A, Kalashnikova G, Bianchi R, Pini G, Tropea F, Caranti C, Franceschi C. Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: a flow cytometry analysis with implications for male infertility. Experimental Cell Research, 1998; 241: 384-93.
- [47] COSNTANZO LS. Fisiologia 5th ed. Tradução, Elsevier 2014.
- [48] Dutta S, Majzoub A, Agarwal A. Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management. Arab Journal of Urology, 2019; 17(2): 87-97.
- [49] Sansegundo E, Tourmente M, Roldan ERS. Energy metabolism and hyperactivation of spermatozoa from three mouse species under capacitating conditions. Cells, 2022; 11: 220. <https://doi.org/10.3390/cells11020220>
- [50] Bergstein TG, Weiss RR, Bicudo SD. Técnicas de análise de semen. Revista Brasileira de Reprodução Animal, 2014 out/dez; 38(4): 189-94.
- [51] Maitan P, Bromfield EG, Stout TAE, Gadella BM, Leemans B. A stallion spermatozoon's journey through the mare's genital tract: *In vivo* and *in vitro* aspects of sperm capacitation. Animal Reproduction Science, <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106848>
- [52] Silva ECB, Guerra MMP. Sondas fluorescentes: um avanço na avaliação da integridade estrutural e funcional de espermatozoides. Revista de Ciências Agroveterinárias, 2012; 11(2): 162-69.
- [53] Simões R, Siqueira AFP, Nichi M, Visintin JA, Assumpção MEOD. Sperm DNA quality and its implication on bovine early embryo development. Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP, 2014; 12(3): 18-35.
- [54] Steckler D, Stout TAE, Durandt C, Nöthling JO. Validation of merocyanine 540 staining as a technique for assessing capacitation-related membrane destabilization of fresh dog sperm. Theriogenology, 2015; 83:1451-60.