

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

LUÍS CLÁUDIO OLIVEIRA MOURA

**CONGELAÇÃO DE SÊMEN OVINO: COMPARAÇÃO ENTRE DILUIDORES
CONTENDO DIFERENTES ASSOCIAÇÕES DE LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA
DENSIDADE, GLICEROL E ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS**

ILHÉUS – BAHIA

2012

LUÍS CLÁUDIO OLIVEIRA MOURA

**CONGELAÇÃO DE SÊMEN OVINO: COMPARAÇÃO ENTRE DILUIDORES
CONTENDO DIFERENTES ASSOCIAÇÕES DE LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA
DENSIDADE, GLICEROL E ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS**

Dissertação apresentada a Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Produção e Reprodução Animal.

Orientadora: Prof. Dra. Paola Pereira das Neves Snoeck

ILHÉUS – BAHIA

2012

M929

Moura, Luís Cláudio Oliveira.

Congelação de sêmen ovino: comparação entre diluidores contendo diferentes associações de lipoproteínas de baixa densidade, glicerol e antioxidantes não enzimáticos / Luís Cláudio Oliveira Moura. – Ilhéus, BA: UESC, 2012.

xviii, 98f.: il.; anexo.

Orientadora: Paola Pereira das Neves Snoeck.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – PPGCA.
Inclui referências.

1. Reprodução animal. 2. Criopreservação animal. 3. Antioxidantes. 4. Lipoproteínas. 5. Carneiros. 6. Espermatozoides. I. Título.

CDD 636.0824

Moura, Luís Cláudio Oliveira

Congelação de sêmen ovino: Comparação entre diluidores contendo diferentes associações de Lipoproteínas de Baixa Densidade, glicerol e antioxidantes não enzimáticos– Ilhéus, 2012.

Orientadora: Snoeck, Paola Pereira das Neves.

Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC.

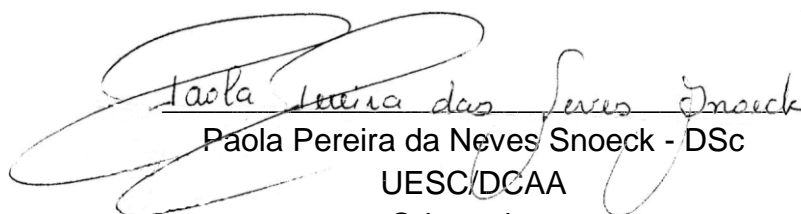
Área de concentração: Produção e Reprodução Animal

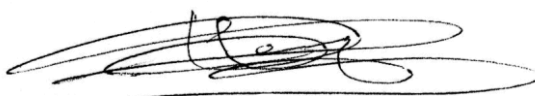
1.Palmitato de Ascorbila; 2.Criopreservação; 3.Lipoproteína; 4.Carneiro;
5.Espermatozoides.

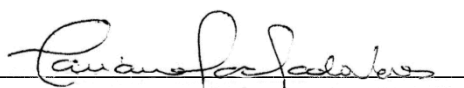
LUÍS CLÁUDIO OLIVEIRA MOURA

**CONGELAÇÃO DE SÊMEN OVINO: COMPARAÇÃO ENTRE DILUIDORES
CONTENDO DIFERENTES ASSOCIAÇÕES DE LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA
DENSIDADE, GLICEROL E ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS**

Ilhéus – BA, 17/07/2012


Paola Pereira da Neves Snoeck - DSc
UESC/DCAA
Orientadora


Marc Roger Jean Marie Henry- DSc
UFMG/DCCV


Mariana Machado Neves - DSc
UFV/DBG

ILHÉUS – BAHIA

2012

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Antonio e Olga,
meus alicerces, meus conselheiros,
por me apoiarem nessa conquista.

Aos meus irmãos Zélia, Felipe e Rafael,
tios, tias, primos e primas,
amigos e companheiros de todas as horas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Pai Celestial, força que rege o universo, por ter me dado a família maravilhosa que tenho e por todas as oportunidades que ele me deu durante a minha longa trajetória, sem ele nada teria a razão de ser.

Agradeço aos meus Pais Antonio e Olga, pessoas fundamentais para minha existência e meu crescimento, sem eles nada que alcancei até agora seria possível; são as pessoas que mais amo nessa vida.

Não posso esquecer também dos meus irmãos Zélia, Felipe e Rafael, que me proporcionaram muitos momentos de alegria e felicidade, sempre quando estamos juntos ou separados. Aos meus familiares tios, tias, primos, primas e minha avó Ivone, meu carinho e respeito, muito obrigado pelo apoio. “In memoriam” gostaria de deixar registrado o meu agradecimento, aos meus avós Antonio da Silva, Jandira, Deolegario e Bisavó Nininha, sei que vocês sempre me acompanharam e continuam me acompanhando de onde estão.

Ao meus Professores, obrigado não só pelos ensinamentos de sala de aula, mas sim pela lição de vida que aprendi com vocês dia após dia.

Em especial gostaria de agradecer a Paola, minha orientadora, que me ajudou muito em todos os momentos do Mestrado, conviveu com minhas dificuldades e me ajudou a superá-las. Obrigado por tudo.

Aos meus colegas de sala de aula, já sinto saudades. Agradeço a companhia, durante esse período, de Danielle Ferreira, Ícaro Cabral, Jéssica Tigre, Uillians Volkart, Joany Reis e Sônia Lopo. Em especial agradeço a Luciana Guimarães, pelos conselhos, e a Maíra Corona, pela ajuda imprescindível durante esses dois anos.

Aos velhos amigos Selma, Carolina Maria, Raquel Cabala, Diêgo Andrade, Taiane Nascimento e Rodrigo Bittar, obrigado pela amizade, paciência e compreensão.

Aos amigos que conquistei durante essa trajetória, Cairo Henrique, Paula Nascimento, André Penido, Jordana Santana, Ana Passarella, Bruno Loiacono, obrigado pela amizade.

Aos novos amigos do grupo de pesquisa Carlos Clemente, Ana Maria Loiaza, Ana Cláudia Dumont, Beatriz Parzewisk, Mariana Araújo, Valéria Moustacas e Betina Cruz, obrigado pela ajuda e amizade durante a execução do projeto.

Aos professores Marcos Xavier, Maria Isabel e ao amigo Milton Rezende que ajudaram nas análises estatísticas dos experimentos e a professora Mariana Neves que ajudou com seus conhecimentos sobre Lipoproteína de Baixa Densidade, obrigado.

Ao prof. Marc Henry, pela oportunidade de realizar os experimentos nas dependências do Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia da EV-UFMG, pela amizade e confiança.

Nada mais posso fazer se não agradecer a todos que passaram por minha vida contribuindo com coisas boas e ruins.

Muito Obrigado!

CONGELAÇÃO DE SÊMEN OVINO: COMPARAÇÃO ENTRE DILUIDORES CONTENDO DIFERENTES ASSOCIAÇÕES DE LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE, GLICEROL E ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a associação entre diferentes concentrações de Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL) e glicerol adicionados antioxidantes não enzimáticos ao meio diluidor para congelação de sêmen ovino no intuito de maximizar o potencial crioprotetor do diluidor. Nos três experimentos foram utilizados 18 ejaculados/cadade carneiros da raça Santa Inês. No experimento I cada ejaculado foi diluídos em dez diluidores contendo diferentes combinações de LDL a 2, 8 e 16% e glicerol a 3, 5 e 7%. Nos experimento II e III, os ejaculados foram divididos e diluídos em seis diferentes diluidores para testar as concentrações de 2% de LDL (experimento II) e 8% de LDL (no experimento III), associados a 5% de glicerol e a 10mM dos antioxidantes não enzimáticos:Ácido Ascórbico (AA), Butilato de Hidroxitolueno (BHT), Palmitato de Ascorbila (PA) e Trealose (TE). O sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 mL e submetido a curva de resfriamento de -0,25 °C/min até a temperatura de 5 °C, permanecendo em equilíbrio por 2 horas e depois foi congelado em curva de -25 °C/min até -140 °C na máquina de congelação TK4000®.Ao fim da congelação as palhetas foram armazenadas em botijão criogênico. As amostras foram descongeladas em banho-maria a 38 °C/30 s e submetidas à análise computadorizada (CASA). Para análise da integridade funcional e estrutural da membrana plasmática, utilizou-se o teste hiposmótico (HO) e teste de sondas fluorescentes (CFDA/PI), respectivamente. No experimento I, o diluidor G5L2 preservou melhor a motilidade total e progressiva, sendo superior ao Controle e ao G7L2 em ambos os parâmetros ($P < 0,05$). No experimento II o diluidor contendo G5L2 + PA não preservou a motilidade após a descongelação ($P < 0,05$) e não resistiu ao TTR.No experimento III os diluidores G5L8 e G5L8 + BHT preservaram melhor a motilidade total e progressiva pós-descongelação, sendo superior ao controle na maioria dos parâmetros, exceto LIN e ALH. Em conclusão, a

substituição da gema de ovo por LDL melhorou a qualidade dos espermatozoides pós-descongelamento. Enquanto o butilato de hidroxitolueno foi capaz de sustentar melhor a motilidade espermática dos carneiros durante a incubação e o palmitato de ascorbila apresentou toxicidade e impediu a motilidade espermática.

Palavras-chave:Palmitato de Ascorbila; Criopreservação; Lipoproteína;Carneiro; Espermatozoides.

**FREEZING OF RAM SEMEN: COMPARISON BETWEEN EXTENDERS
CONTAINING DIFFERENT ASSOCIATIONS OF LOW DENSITY LIPOPROTEINS,
GLYCEROL AND NON-ENZYMATIC ANTIOXIDANTS**

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate an association between different concentrations Low Density Lipoproteins (LDL) and glycerol if the addition of non-enzymatic antioxidants in the extender medium for freezing ram semen in order to maximize the diluting cryoprotectant potential. In the experiment I, II e III, 18 ejaculates of Santa Inês rams were used. In the experiment I, semen was diluted in ten extenders containing different combination of LDL at 2, 8 and 16% and glycerol and at 3, 5 and 7%. In Experiment II and III, the ejaculates were divided and diluted in six different extenders, in each experiment, to test the effect of concentrations of 2% LDL (experiment II) and 8% LDL (experiment III), associated with 5% glycerol and 10mM of non-enzymatic antioxidants: Ascorbic Acid (AA), Hydroxytoluene Butylate (HB), Ascorbyl Palmitate (AP) and Trehalose (TH) to preserve semen. The semen was packaged in 0.25 mL straws and subjected to a cooling curve of -0.25 °C/min to a temperature of 5 °C, remaining in equilibrium for 2 hours and then frozen in curve at -25 °C/min up to -140 °C in the TK4000® freezing machine. At the end of freezing, straws were stored in cryogenic cylinders. The samples were thawed in a water bath at 38 °C/30s and subjected to computerized analysis (CASA). To analyze the functional and structural integrity of the plasma membrane, the hyposmotic test (HO) and fluorescent probe test (CFDA / PI) were used, respectively. In experiment I, the G5L2 extender preserved better total and progressive motility, being higher than the control extender and G7L2 in both parameters ($P < 0.05$). In experiment II, G5L2 + AP extender didn't preserve total motility immediately after defrosting ($P < 0.05$), and in experiment III, the G5L8 and G5L8 + HB extenders preserved better total and progressive post-thaw motility, being superior to the control extender in most parameters, except LIN and ALH. In conclusion, the replacement of egg yolk with LDL improved the quality of post-thaw sperm. While hydroxytoluene butylate was

able to better support sperm motility in sheep during incubation and ascorbyl palmitate showed toxicity and prevented sperm motility.

Keywords:Ascorbyl palmitate; Cryopreservation; Lipoprotein; Sheep; Spermatozoa

LISTA DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|--------|---|--------|
| 1 | Anatomia descritiva do espermatozoide. Corte Sagital da cabeça e cauda | 22 |
| 2 | Representação da Membrana Plasmática e seus constituintes ultra-estruturais | 24 |
| 3 | Teste hiposmótico em sêmen ovino | 39 |
| 4 | Espermatozoides corados pela associação das sondas fluorescentes Iodeto de Propídio (PI) e Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) | 40 |
| 5 | Schematic depiction of the study design. For all experiments, three ejaculates from six Santa Inês rams were collected with an artificial vagina and individually split into extenders tested, to a final concentration of 100×10^6 motile sperm/mL. Tris-glucose base extender containing 16% egg yolk and 5% glycerol was used as Control. For Experiment I, a base extender with no egg yolk and different glycerol (G3, 5, or 7%) and low-density lipoprotein (L2, 8, or 16%) concentrations were used. For Experiments II and III, 10 mM of antioxidants were added in the extenders selected based on the results of Experiment I (G5L2 and G5L8, respectively). | 45 |
| 6 | Experiment I ram sperm frozen in Tris-glucose base extender containing 16% egg yolk and 5% glycerol (Control, C) or using base extender with no egg yolk and different glycerol (G3, 5, or 7%) and low-density lipoprotein (L2, 8, or 16%) concentrations. Structural (IP-CFDA ⁺) and functional integrity (hypoosmotic test) post-thaw. Different letters indicate differences among treatments ($P < 0.05$). | 52 |

- 7 **Experiment II** ram sperm frozen in Tris-glucose base extender 56
containing 16% egg yolk and 5% glycerol (Control, C) or using
base extender with no egg yolk, 5% glycerol and 2% low-density
lipoprotein (G5L2) with addition of different non-enzymatic
antioxidants (10 mM). Structural (IP-CFDA⁺) and functional
integrity (hypoosmotic test) post-thaw. AA: ascorbic acid, HB:
hydroxytoluene butylate, AP: ascorbyl palmitate, TH: trehalose.
Different letters indicate differences among treatments (P < 0.05).
- 8 **Experiment III** ram sperm frozen in Tris-glucose base extender 57
containing 16% egg yolk and 5% glycerol (Control, C) or using
base extender with no egg yolk, 5% glycerol and 8% low-density
lipoprotein (G5L8) with addition of different non-enzymatic
antioxidants (10 mM). Structural (IP-CFDA⁺) and functional integrity
(hypoosmotic test) post-thaw. AA: ascorbic acid, HB:
hydroxytoluene butylate, AP: ascorbyl palmitate, TH: trehalose.
Different letters indicate statistical differences between treatments
(P < 0.05).

LISTA DE TABELAS

| Tabela | | Página |
|--------|--|--------|
| 1 | Post-thaw kinematic parameters of ram sperm (mean \pm SEM) frozen in Tris-glucose base extender containing 16% egg yolk and 5% glycerol (Control) or using base extender with no egg yolk and different glycerol (G3, 5, or 7%) and low-density lipoprotein (L2, 8, or 16%) concentrations. | 50 |
| 2 | Kinematic parameters of ram sperm (mean \pm SEM) frozen in Tris-glucose base extender containing 16% egg yolk and 5% glycerol (Control) or using base extender with no egg yolk and different glycerol (G3, 5, or 7%) and low-density lipoprotein (L2, 8, or 16%) concentrations during 3h of incubation at 38 °C after thawing. | 51 |
| 3 | Post-thaw kinematic parameters of ram sperm (mean \pm SEM) frozen in Tris-glucose base extender containing 16% egg yolk and 5% glycerol (Control) or using base extender with no egg yolk, 5% glycerol and 2% low-density lipoprotein (G5L2) with addition of different non-enzymatic antioxidants (10 mM). | 53 |
| 4 | Kinematic parameters of ram sperm (mean \pm SEM) frozen in Tris-glucose base extender containing 16% egg yolk and 5% glycerol (Control) or using base extender with no egg yolk, 5% glycerol and 2% low-density lipoprotein (G5L2) with addition of different non-enzymatic antioxidants (10 mM) during 3h of incubation at 38 °C after thawing. | 55 |
| 5 | Post-thaw kinematic parameters of ram sperm (mean \pm SEM) frozen in Tris-glucose base extender containing 16% egg yolk and 5% glycerol (Control) or using base extender with no egg yolk, 5% glycerol and 8% low-density lipoprotein (G5L8) with addition of different non-enzymatic antioxidants (10 mM). | 56 |

- 6 Kinematic parameters of ram sperm (mean \pm SEM) frozen in Tris-glucose base extender containing 16% egg yolk and 5% glycerol (Control) or using base extender with no egg yolk, 5% glycerol and 8% low-density lipoprotein (G5L8) with addition of different non-enzymatic antioxidants (10 mM) during 3h of incubation at 38 °C after thawing. 57

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

| | |
|-------|---|
| ALH | Amplitude lateral da cabeça |
| ANOVA | Análise de variância |
| BCF | Freqüência de batimentos flagelares |
| BSP | Proteína do plasma seminal bovino |
| CASA | <i>Computer Assisted Semen Analysis</i> |
| CFDA | Diacetato de Carboxifluoresceína |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| ROS | Espécies Reativas de Oxigênio |
| G | Grama |
| GSSG | Glutathiona Oxidada |
| h | Horas |
| HO | Teste Hiposmótico |
| Hz | Hertz |
| IA | Inseminação Artificial |
| LDL | Lipoproteína de Baixa Densidade |
| LIN | Linearidade |
| Mg | Miligrama |
| Min | Minuto |
| mL | Mililitro |
| P | Nível de significância |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| PI | Iodeto de Propídeo |
| SOD | Superóxido Dismutase |
| S | Segundos |
| SCA | <i>Sperm Class Analyser</i> |
| Sptzs | Espermatozoides |
| STR | Retilinearidade |
| Tris | Tris hidroximetil aminometano |
| TTR | Teste de termorresistência |
| VAP | Velocidade média do trajeto |
| VCL | Velocidade curvilínea |

| | |
|-----|-------------------------------|
| VSL | Velocidade linear progressiva |
| ZP | Zona Pelúcida |
| µL | Microlitro |
| °C | Graus Célsius |
| % | Porcentagem |
| ® | Marca registrada |

SUMÁRIO

| | Página |
|--|--------|
| 1. INTRODUÇÃO | 19 |
| 2. OBJETIVOS | 21 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA | 22 |
| 3.1. Os espermatozoides | 22 |
| 3.2. Espécies Reativas de Oxigênio | 25 |
| 3.3. Criopreservação | 27 |
| 3.4. Diluidores | 28 |
| <i>3.4.1. Lipoproteína de Baixa Densidade</i> | 29 |
| <i>3.4.2. Glicerol</i> | 30 |
| <i>3.4.3. Antioxidantes</i> | 31 |
| 3.5. Protocolo de Congelação | 32 |
| <i>3.5.1. Coleta</i> | 32 |
| <i>3.5.2. Diluição</i> | 33 |
| <i>3.5.3. Etapas de resfriamento, congelação e descongelação</i> | 34 |
| 3.6. Avaliação do sêmen pós-descongelação | 36 |
| <i>3.6.1. Motilidade e vigor</i> | 36 |
| <i>3.6.2. Morfologia espermática</i> | 37 |
| <i>3.6.3. Teste de termorresistência</i> | 37 |
| <i>3.6.4. Teste hiposmótico</i> | 38 |
| <i>3.6.5. Sondas fluorescentes</i> | 39 |
| 4. ARTIGO CIENTÍFICO | 41 |
| Introduction | 43 |
| Material and Methods | 45 |
| Results | 49 |
| Discussion | 58 |
| Conclusion | 62 |
| References | 62 |
| 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 74 |
| REFERÊNCIAS | 75 |
| ANEXO | 90 |

1. INTRODUÇÃO

O processo de criopreservação do sêmen é uma importante biotécnica aplicada à reprodução em várias espécies animais. Este vem sendo utilizado com sucesso na espécie bovina (CURRY, 2000), ao contrário de outras espécies, como a ovina, onde a taxa de fertilidade alcançada é baixa (DONOVAN et al., 2004). Alguns são os gargalos que existem no processamento e utilização da criopreservação, como exemplo, a característica da membrana dos espermatozoides, que os torna mais sensível às mudanças de temperatura (OLLERO et al., 1998; SALAMON; MAXWELL, 2000; VALENTE, 2007; KURMA et al., 2009; LEAHY; GADELLA, 2011) e a especificidade da cérvix na ovelha (KERSHAW et al., 2005).

Essa biotecnologia é de fundamental importância quando se fala em conservação e difusão de material genético de grande valor por meio da inseminação artificial (IA) (BAILEY et al., 2000; 2008). Além disso, é uma biotécnica que permite o controle de doenças sexualmente transmissíveis no plantel, sua aplicabilidade no campo facilita o uso de sêmen de boa qualidade por pequenos produtores, além da facilidade na comercialização e transporte de doses de sêmen congeladas, possibilitando aumentar a heterozigose do rebanho, ainda que a IA com sêmen congelado de ovino seja pouco difundida (BAILEY et al., 2000; 2008).

Apesar dessas vantagens o uso do sêmen congelado na espécie ovina ainda não mostra resultados satisfatórios de taxa de prenhez, principalmente quando a IA é realizada por via cervical, isso se dá, à baixa viabilidade do sêmen criopreservado no trato genital da fêmea, em decorrência dos espermatozoides sofrerem um processo de criocapacitação, acarretando às células, danos irreversíveis na membrana plasmática, tanto bioquímico quanto estrutural, além de diminuir a motilidade, o vigor espermático e o tempo de vida da célula, resultando em taxas de fertilidade baixas nos programas de IA (WATSON, 1995; LEAHY; GADELLA, 2011). A conformação da cérvix da ovelha também significa um obstáculo a ser vencido por esses espermatozoides, já que os anéis se encontram dispostos de maneira irregular dificultando a sua transposição (KERSHAW et al., 2005).

Para melhorar os resultados de viabilidade e fertilidade dos espermatozoides criopreservados na espécie ovina, alguns estudos na composição de diluidores seminais são importantes (DOMÍNGUEZ et al., 2008; KULAKSIZ et al., 2010;

TONIETO et al., 2010; MOUSTACAS et al., 2011; SILVA, 2011). Ainda existe um campo para ser desvendado sobre o uso de lipoproteínas de baixa densidade que possuem a propriedade de serem protetoras de membranas, minimizando os efeitos do choque-térmico e terem a vantagem de ser um bioproduto que torna o meio mais quimicamente definido (QUINN et al., 1980; MANJUNATH et al., 2002; BERGERON et al., 2004; HU et al., 2006; VARELLA JR, 2005) e sobre o glicerol, principal crioprotetor intracelular utilizado nos meios de preservação espermática, que irá impedir a formação de macrocristais de gelo no interior da célula (FISER; FAIRFULL, 1986; LOVELOCK; POLGE, 1954; SALAMON; MAXWELL, 2000), além da adição de antioxidantes aos diluidores na tentativa de minimizar ou neutralizar a ação das espécies reativas de oxigênio durante este processo (GADEA et al., 2005; BANSAL; BILASPURI, 2011).

Com base no exposto objetivou-se maximizar o potencial crioprotetor de diluidores de congelação de sêmen ovino com substituição da gema de ovo por diferentes concentrações de Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL) e glicerol, além da adição de antioxidantes não enzimáticos para controlar o efeito negativo das espécies reativas ao oxigênio

2. OBJETIVOS

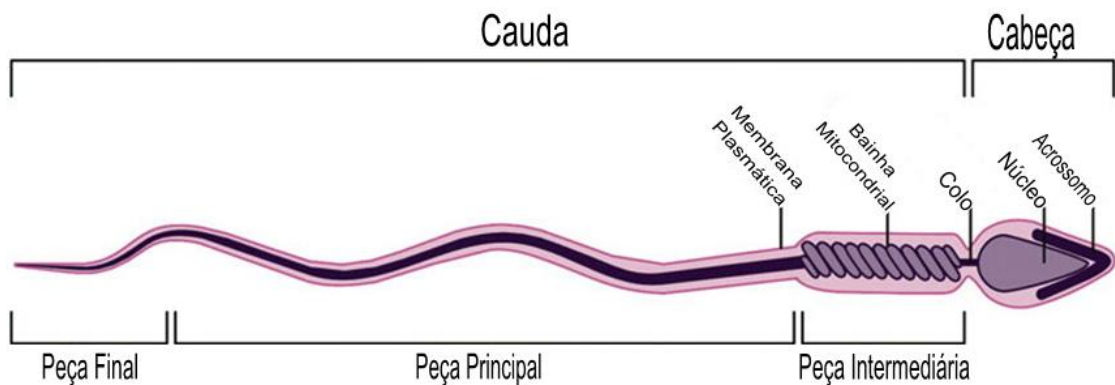
- Avaliar o efeito da associação entre diferentes concentrações de LDL e glicerol em diluidor Tris-glicose para saber qual a melhor para preservar a motilidade, parâmetros cinemáticos e integridade funcional e estrutural das membranas espermáticas durante a criopreservação;
- Avaliar qual o melhor antioxidante não enzimático entre Ácido Ascórbico, Butilato de Hidroxitolueno, Palmitato de Ascorbilae Trealose para maximizar o potencial do diluidor contendo LDL para preservar a motilidade, parâmetros cinemáticos e integridade funcional e estrutural das membranas espermáticas durante a criopreservação.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Os espermatozoides

Os gametas masculinos denominados espermatozoides, são formados dentro dos túbulos seminíferos nos testículos após a espermatogênese, processo pelo qual as células germinativas redondas sofrem uma série de modificações morfológicas originando células haplóides (LEAHY; GADELLA, 2011). Quando ejaculados, os espermatozoides ficam em uma suspensão celular líquida, denominada plasma seminal, que irá nutri-los e protegê-los. Os espermatozoides morfológicamente perfeitos possuem cabeça achatada contendo o núcleo e uma cauda essencial para motilidade celular, sendo todo recoberto por membrana plasmática (Figura 1) (GARNER; HAFEZ, 2004; BEDFORD, 2006).

Figura 1 - Anatomia descritiva do espermatozoide. Corte Sagital da cabeça e cauda.



Fonte: Adaptado de BORG et al., 2010.

A cabeça do espermatozoide se divide em duas partes: área anterior e posterior do acrossomo e tem como principal característica o núcleo achatado em forma oval, com cromatina altamente condensada. O núcleo corresponde a 65% da cabeça do espermatozoide, nele está contido metade do número de cromossomos, o correspondente a parte paterna. A extremidade anterior desse núcleo é envolvida por uma espécie de capuchão, denominado acrossomo, contendo acrosina, hialuronidase e outras enzimas hidrolíticas envolvidas no processo de fertilização (BARTH; OKO, 1989). O achatamento dorso-ventral de sua cabeça permite a movimentação lateral do espermatozoide durante a penetração nas células foliculares e ligação na zona pelúcida do oócito (GARNER; HAFEZ, 2004).

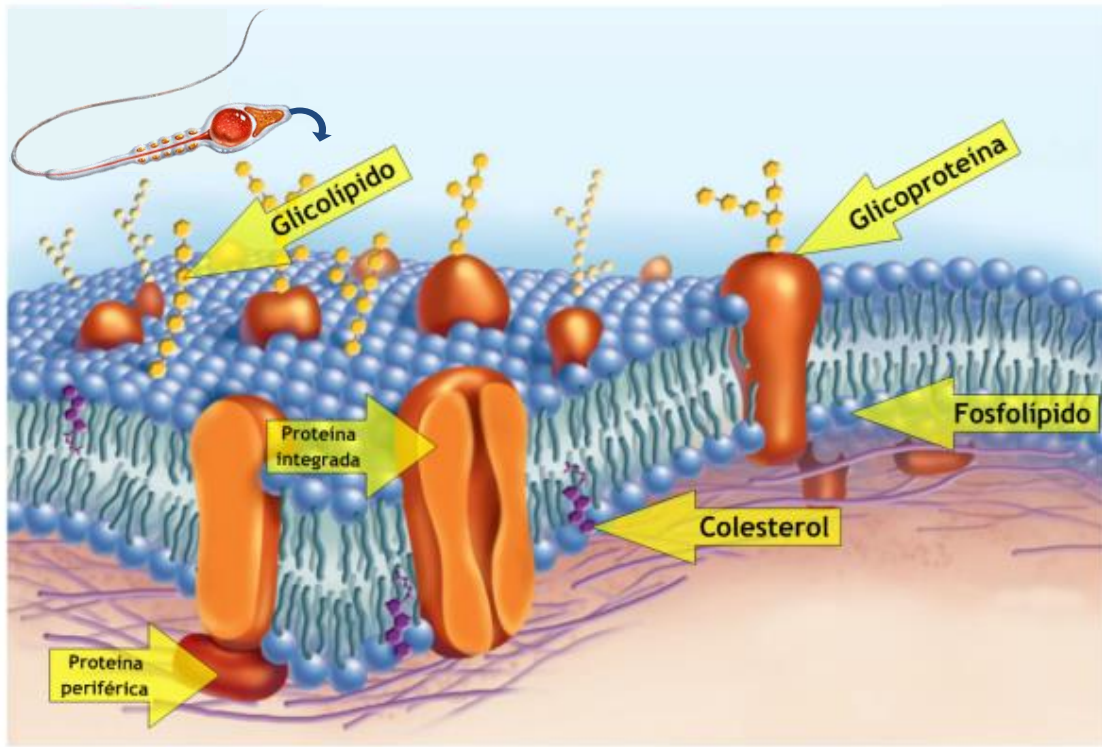
A cauda do espermatozoide, sistema propulsor para mover o núcleo, pode ser dividida em colo e peças intermediária, principal e terminal. O colo é a peça mais proximal do flagelo, é responsável por fazer a junção da cabeça com a peça intermediária do espermatozoide, formando uma placa basal com nove grosseiras fibras que se projetam ao longo de quase toda a cauda (BARTH; OKO, 1989).

A cauda possui uma estrutura denominada de axonema, composta de nove pares de microtúbulos ao redor de dois filamentos centrais, circundados por nove fibras externas densas, recobertas por mitocôndrias na região da peça intermediária. Essa bainha mitocondrial envolvendo as fibras longitudinais da cauda gera a energia necessária para a motilidade da célula espermática (TURNER, 2006).

A peça principal é composta pelo axonema e suas fibras externas densas, enquanto que a peça terminal apenas pelo axonema recoberto pela membrana plasmática. O axonema é responsável pela motilidade do espermatozoide, através do deslizamento dos pares adjacentes dos microtúbulos gerando as curvaturas na cauda (BORG et al., 2010).

A membrana plasmática (Figura 2), estrutura que recobre o espermatozoide, é composta por lipídios e proteínas unidas por ligações lipídio-lipídio e lipídio-proteína, se encontra em estado fluído e dinâmico em temperatura corpórea. Uma característica importante na maioria das membranas biológicas é a assimetria existente entre os lipídeos que a compõem, o que não é diferente na membrana plasmática do espermatozoide (POULOS et al., 1973a; WOLFE et al., 1998). Em sua composição são encontrados quatro grandes grupos de lipídios: fosfolipídios, colesterol, glicolipídios e diglicéridios, variando as suas porcentagens de acordo com cada espécie animal. A dupla camada fosfolipídica funciona com uma espécie de barreira seletiva, impermeável a maioria das moléculas hidro-solúveis (VALENTE, 2007).

Figura 2 - Representação da Membrana Plasmática e seus constituintes ultra-estruturais.



Fonte: Adaptado de <<http://www.cientific.com>>. Acesso em 16 de jan. 2012

Os fosfolípidos encontrados na composição da membrana desempenham o papel de manutenção da integridade estrutural da membrana e também serve como fonte de substrato oxidável ao espermatozoide (POULOS et al., 1973a).

Percebe-se que os espermatozoides contidos nos testículos possuem uma maior concentração de fosfolípidos do que os contidos no ejaculado, atribui-se essa diferença ao uso desses fosfolípidos como nutrientes durante a passagem espermática pelo epidídimo. Essa alteração na concentração pode ter efeito sobre a estrutura da membrana podendo levar a importantes prejuízos sobre a sobrevivência dessas células no trato reprodutivo da fêmea (POULOS et al., 1973b).

No carneiro há uma diminuição do colesterol em cerca de 50% durante o trânsito epididimário, enquanto que a proporção de ácidos graxos insaturados aumentam. Essas mudanças ocorrem para possibilitar a capacitação espermática, interação com a zona pelúcida e fecundação (PARKS; HAMMERSTEDT, 1985; LEAHY; GADELLA, 2011).

Para se obter sucesso na fecundação do oócito é necessário que o espermatozoide possua suas membranas íntegras, organelas competentes e

genoma intacto (SILVA; GADELLA, 2006), o que nem sempre é possível devido a geração espécies reativas de oxigênio durante o processo de produção de energia.

3.2. Espécies Reativas de Oxigênio

A produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) pelo espermatozoide é um processo fisiológico normal decorrente do metabolismo oxidativo da célula, no entanto o desequilíbrio entre sua produção e degradação gera prejuízo as funções espermáticas e pode ser associado a causas de infertilidade (SHARMA; AGARWAL, 1996). O desequilíbrio entre a produção de ROS e atividade de limpeza e reparação dos danos resultantes, é conhecida como estresse oxidativo (TREMELLEN, 2008; BANSAL; BILASPURI, 2011).A geração desses tipos de radicais livres ocorre dentro da mitocôndria, durante o processo de produção de energia pelo organismo, onde ocorrem reações enzimáticas entre o oxigênio e o hidrogênio durante o metabolismo oxidativo (TREMELLEN, 2008).

Os radicais livres contêm um ou mais elétrons desemparelhados em suas orbitas (TREMELLEN, 2008; BANSAL; BILASPURI, 2011, induzindo danos celulares quando passam esse elétron para estruturas celulares próximas, resultando na oxidação dentro do DNA, de lipídios da membrana celular ou aminoácidos em proteínas (BANSAL; BILASPURI, 2011), que podem levar a morte celular (BILODEAU et al., 2000).

Os gametas masculinos são susceptíveis ao ataque dos ROS (BANSAL; BILASPURI, 2011). A produção de ROS por espermatozoides com funções anormais, morfológicamente anormais e/ou imóveis, ocorre provavelmente devido à inativação dos sistemas antioxidantes destas células, sendo estas as principais fontes de ROS no sêmen (ENGEL et al., 1999; RHEMREV et al., 2001; AJAY et al., 2011).Além disso,os espermatozoides podem sofrer estresse oxidativo, devido a centrifugação excessiva, a congelação e a descongelação (SIKKA, 2004).

Os efeitos do estresse oxidativo no espermatozoide são potencializados durante o resfriamento e congelação, podendo se agravar quando parte do plasma seminal rico em substâncias antioxidantes é removido (BALL, 2008). Todos os componentes celulares incluindo lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e açúcares são alvos potenciais de estresse oxidativo (BANSAL; BILASPURI, 2011), sendo

asmembranas o principal local de ação das ROS durante a criopreservação (AJAY et al., 2011; PARTYKA et al., 2012).

Pode ocorrer também produção de ROS por células que possuem resíduos de citoplasma (AGARWAL et al., 2005). A capacidade dos espermatozoides de produzirem ROS é inversamente proporcional a sua maturidade. Espermatozoides mais imaturos possuem em excesso resíduos de citoplasma na peça intermediária, levando a uma maior produção de ROS em comparação aos espermatozoides morfológicamente normais (TREMELLEN, 2008).

Mesmo sendo um processo muitas vezes prejudicial para os espermatozoides, a produção de ROS, de maneira controlada, é de fundamental importância para a regulação da taxa de hiperativação, para a ocorrência da reação acrossomal e para a fusão dos gametas (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1993; BANSAL; BILASPURI, 2011).

Não só *“in vivo”*, mais também *“in vitro”* pode haver a geração de ROS, estando listados entre os principais fatores que contribuem para o acúmulo de ROS *“in vitro”*, a ausência do mecanismo de defesa endógeno, a exposição dos gametas a várias técnicas de manipulação e a ambientes que podem gerar estresse oxidativo (BANSAL; BILASPURI, 2011).

Em excesso as ROS acarretam prejuízos para a concentração, a motilidade e a morfologia espermática e causam danos ao DNA, além de contribuir com a diminuição na taxa de reação acrossômica, capacitação espermática e ligação com o oócito (AITKEN et al., 1989; AGARWAL et al., 1994; SUDJARWO et al., 2006; TREMELLEN, 2008; BANSAL; BILASPURI, 2011). Isso se deve provavelmente à peroxidação dos ácidos graxos insaturados da membrana plasmática espermática (AITKEN et al., 1993). A explicação para esse processo ser tão nocivo aos espermatozoides dos mamíferos pode se dar pelo fato deles possuírem em sua membrana uma alta quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (AITKEN et al., 1989; SIKKA, 2004) e baixas concentrações de enzimas antioxidantes em seu citoplasma (SHARMA; AGARWAL, 1996). Segundo Nichi (2003) um dos fatores de maior significância no que diz respeito ao estresse oxidativo é a sua alta correlação negativa com a fertilidade, estando a produção ou presença de ROS ligados diretamente aos prejuízos na função espermática.

3.3. Criopreservação

A diminuição da fertilidade do sêmen pode está também ligada ao processo de criopreservação (WATSON, 1995). A fim de diminuir os danos causados pelo mesmo, é necessária a realização da criopreservação em várias etapas (BUENO, 2000).

Na maioria das espécies o sêmen é inicialmente resfriado até 5° C (KURMA et al., 2009). Durante esse período o ponto críticoda queda de temperatura se dá entre 19 e 8 °C, sendo necessário o uso de uma curva de resfriamento lenta (-0,05 °C/min), além do uso de lipoproteínas ou lipídios nos diluidores, para minimizar os danos causados por esse processo, no período em que ocorrerá mudança na membrana plasmática do estado líquido para gel (MELO, 2003).

Caso o resfriamento seja realizado de maneira inadequada, ocorrerá choque térmico que levará a danos irreversíveis a célula, caracterizados por alterações nos padrões de motilidade, danos no metabolismo e nas membranas (KURMA et al., 2009).

Na etapa seguinte, durante o processo de congelação, os espermatozoides atingem temperaturas abaixo do ponto de congelação do meio, antes que haja a formação de cristais de gelo. Quando os cristais de gelo se formam, há o aumento da temperatura necessária para a cristalização, levando os espermatozoides a sofrerem alterações celulares e subcelulares que comprometem a sua fertilidade. O uso de curvas de congelação adequadas para cada espécie diminui as injúrias sofridas por essas células (FÜRST, 2006).

A curva de congelação deve ser lenta o suficiente para permitir que a água deixe a célula por osmose, a fim de evitar a congelação da água existente dentro da célula e rápida o suficiente para evitar que essa célula desidratada fique em contato com o meio hiperosmótico por muito tempo, já que isso pode ser tóxico para a célula. A perda da água para o meio externo e a desidratação, são eventos desejáveis, já que impedem a formação de grandes cristais de gelo que poderiam lesar as estruturas internas e a membrana. A velocidade da descongelação irá depender diretamente da velocidade da congelação, pois taxas de congelação rápidas exigem taxas de descongelação também rápidas, enquanto células congeladas mais lentas devem ser descongeladas lentamente (MAZUR, 1984).

As mudanças de temperatura durante o resfriamento, congelação e descongelação podem causar danos irreversíveis nas membranas do espermatozoide, reduzindo o número de células viáveis, o que faz cair sua taxa de fertilização, já que é de crucial importância para a capacitação espermática e fecundação do oócito que estas membranas estejam funcionalmente e estruturalmente íntegras (OLLERO et al., 1998; SALAMON; MAXWELL, 2000).

3.4. Diluidores

Os meios diluidores utilizados para conservação de sêmen ovino, como para outras espécies, geralmente devem possuir substâncias que promovam a preservação das características da membrana plasmática, mediante a neutralização de agentes tóxicos, estabilização do pH, proteção contra choque térmico, inibição de agentes bacterianos, fornecimento de energia e manutenção do equilíbrio eletrolítico e osmótico, pois o plasma seminal sozinho não é capaz de proteger os espermatozoides durante o resfriamento e congelação (SALAMON; MAXWELL, 2000; JONHSON et al., 2000). De modo geral o diluidor deve ser constituído de crioprotetores, substâncias tamponadoras, açúcares para fornecer energia à célula e antibióticos para inibir o crescimento bacteriano (SALAMON; MAXWELL, 2000).

Os diluidores possuem uma combinação de substâncias crioprotetoras. Essas substâncias são classificadas como crioprotetores intracelulares e extracelulares. Os crioprotetores intracelulares penetram através das membranas para dentro do espermatozoide e são responsáveis por reduzir o seu ponto de congelação. Já crioprotetores extracelulares agem como tampões osmóticos atuando na desidratação da célula, reduzindo a formação de gelo intracelular (WATSON, 1995; PICKETT, 1992).

O diluidor mais usado na congelação de sêmen ovino é o TRIS (Tris hidroximetil aminometano), podendo está associado a diversos crioprotetores a exemplo do leite de vaca, frutose, sacarose, glicerol e outros (SALAMON; MAXWELL, 2000). A gema de ovo é o agente crioprotetor extracelular mais utilizado como componente de diluidores seminais em diversas espécies, inclusive na ovina (EIMAN et al, 2004; FOROUZANFAR et al., 2010), conferindo proteção aos espermatozoides através dos lipídios encontrados nela, que irão interagir com os da

membrana, formando uma barreira física ou substituindo os lipídios perdidos durante o processo de criopreservação, estabilizando a mesma, diminuindo o rearranjo entre os lipídios dessa membrana, minimizando danos a ela durante o processo de congelação-descongelação (RICKER et al., 2006).

3.4.1. Lipoproteína de Baixa Densidade

Desde a descoberta da eficácia da gema de ovo na conservação de sêmen em baixas temperaturas, esta vem sendo utilizada como uma das principais substâncias da maioria dos diluidores utilizados em protocolos de congelação do sêmen de diversas espécies (FOULKES, 1977). Porém, o uso da gema de ovo pode ser prejudicial aos espermatozoides por se tratar de um rico meio de cultura bacteriana podendo haver a proliferação de microorganismos patogênicos causando um efeito deletério nas células, além de na ausência de detergentes pode comprometer e dificultar a leitura do percentual de espermatozoides móveis durante a avaliação pós-descongelação (FOULKES, 1977; ALI AL AHMAD et al., 2008).

A gema do ovo é composta de 68% de lipoproteínas de baixa densidade, 16% de lipoproteínas de alta densidade, 10% de livetinas e 4% de fosvitinas (DAUPHAS et al., 2006). Descobriu-se então que a proteção conferida pela gema estava diretamente ligada a lipoproteínas de baixa densidade (LDL) que corresponde a 68% da gema do ovo (83-89% lipídios e 11-17% proteínas), sendo atribuída a este constituinte a proteção contra choques térmicos, redução da perda das enzimas acrossomal e o impedimento de alterações degenerativas no acrossomo (SALOMON; MAXWELL, 2000; BERGERON et al., 2004; DAUPHAS et al., 2006).

Na tentativa de obter melhores resultados de viabilidade espermática pós-descongelação, muitos estudos apresentam o uso da LDL extraída e purificada da gema de ovo como uma alternativa para criopreservação espermática, a qual pode interagir com as proteínas do plasma seminal (BSPs), que são prejudiciais aos espermatozoides após a ejaculação induzindo a perda gradativa de lipídios da membrana. Nesse caso a LDL irá interagir com as BSPs formando o complexo LDL-BSP impedindo o efluxo de lipídios da membrana, sendo este complexo estável mesmo após a congelação-descongelação (MANJUNATH et al, 2002; BERGERON et al., 2004). Outra hipótese é que a LDL ao entrar em contato com o espermatozoide

irá formar uma espécie de película protetora, conferindo imediatamente proteção à célula contra o choque frio (QUINN et al., 1980; HU et al., 2006).

De uma forma ou de outra, a eficácia da LDL em proteger os espermatozoides já foi comprovada em várias espécies animais (AMIRAT et al., 2005; ALI AL AHMAD et al., 2008; PILLET et al., 2011; PRAPAIWAN et al., 2011; DONG et al., 2011), dentre elas na espécie ovina, obtendo bons resultados utilizando as concentrações de 8% (TONIETO et al., 2010; MOUSTACAS et al., 2011), 10 e 20% (SILVA, 2011).

3.4.2. *Glicerol*

O glicerol é o crioprotetor intracelular mais utilizado para a proteção da célula espermática nos diluidores para congelação do sêmen ovino (SALOMON; MAXWELL, 2000). A sua descoberta como crioprotetor foi um marco no processo de criopreservação induziu ao novo sistema de armazenamento, o qual é amplamente utilizado até hoje (VISHWANATH; SHANNON, 2000).

Em seus estudos Pace e Graham (1974) demonstraram que um diluidor constituído com gema de ovo sem a adição de glicerol confere 24% de motilidade pós-descongelação. Quando feita a interação gema e glicerol essa porcentagem subiu para 40%, demonstrando que o glicerol potencializa o efeito da gema, evidenciando a habilidade que o glicerol possui em proteger o espermatozoide durante o processo de congelação.

O glicerol age de duas formas: reduzindo a formação de gelo no interior da célula e aumentando o tempo para que a água deixe a célula, em ambos os casos o glicerol irá aumentar a viscosidade das soluções intra e extracelular (FISER; FAIRFULL, 1986).

Os efeitos prejudiciais do glicerol estão diretamente ligados ao impacto osmótico sofrido pelo espermatozoide quando colocado em contato com o meio contendo glicerol. As células irão perder água rapidamente sendo que o volume intracelular será reestabelecido lentamente, à proporção que o glicerol entra na célula (MORRIER et al., 2002). Em concentrações muito altas o glicerol pode intoxicar a célula, levando a danos estruturais (WILMUT; POLGE, 1974).

A concentração ideal de glicerol está diretamente ligada à concentração de espermatozoides finais (COLAS, 1975), sendo que a concentração ideal de glicerol

para a espécie ovina está entre 4 e 8% (FISER; FAIRFULL, 1984; 1986). Foram encontrados bons resultados utilizando 7% (MICLEA et al., 2010) e 3% de glicerol (ABDELHAKEM et al., 1991), mas a concentração de glicerol mais usual em diluidores para congelação na espécie ovina é de 5% (DOMÍNGUEZ et al., 2008; KULAKSIZ et al., 2010; TONIETO et al., 2010; MOUSTACAS et al., 2011). Um fator importante que irá determinar a concentração de glicerol necessária para a crioproteção é a velocidade de congelação que será utilizada (FISER; FAIRFULL, 1986), o tempo de equilíbrio e a temperatura que o glicerol será adicionado ao meio (COLAS, 1975). A interação entre concentração de glicerol e a velocidade de congelação se mostram importantes para a criopreservação do sêmen de carneiro (FISER; FAIRFULL, 1986).

3.4.3. Antioxidantes

Para proteger os espermatozoides dos danos gerados pelas Espécies Reativas de Oxigênio, o organismo desenvolveu estratégias através da ação de antioxidantes, permitindo que o metabolismo oxidativo normal ocorra sem danificar as células (TREMELLEN, 2008). Os antioxidantes são importantes para manter a motilidade espermática, a capacidade do espermatozoide em sofrer a capacitação espermática e reação acrossomal (SIKKA, 2004).

Bilodeau et al. (2000) descobriram que o processo de criopreservação reduz a concentração de dois importantes antioxidantes no sêmen, a Superóxido Dismutase (SOD) e a Glutathiona Oxidada (GSSG), levando a acreditar que essa redução no nível de oxidantes no sêmen pode ter efeito deletério sobre os espermatozoides e contribuir para a redução da fertilidade após a criopreservação.

O plasma seminal é rico em antioxidantes, sendo uma importante fonte de proteção para o espermatozoide contra a ação das espécies reativas de oxigênio, com três formas de mecanismo de ação: prevenção, interceptação e reparação (SIKKA, 2004). Os sistemas antioxidantes, enzimático e não enzimático, agem juntos para tentar impedir a ação dos subprodutos gerados pelas espécies reativas de oxigênio sobre a célula (LUBERDA, 2005).

Os antioxidantes enzimáticos são também conhecidos como antioxidantes naturais, que neutralizam o excesso de espécies reativas de oxigênio e impedem os

danos na estrutura celular (BANSAL; BILASPURI, 2011). A SOD e a catalase são antioxidantes enzimáticos que inativam o ânion superóxido e o peróxido, convertendo-os em água e oxigênio. Há também a glutatona peroxidase dentre os antioxidantes enzimáticos, envolvida na redução de hidroperóxidos (TREMELLEN, 2008).

Os antioxidantes não enzimáticos compreendem um grande número de moléculas, incluindo aminoácidos, peptídeos, proteínas e vitaminas, podendo agir sobre os radicais livres hidrofóbicos e hidrofílicos (BUSTAMANTE FILHO et al, 2009). Os antioxidantes não enzimáticos podem ser conhecidos também como antioxidantes sintéticos ou suplementos dietéticos. O sistema antioxidante dos animais pode ser influenciado pela ingestão de antioxidantes não enzimáticos (BANSAL; BILASPURI, 2011). Dentre os antioxidantes não enzimáticos tem o ácido ascórbico (vitamina C), que atua protegendo os espermatozoides e suas membranas contra os danos da peroxidação lipídica (SARASWAT et al., 2012), o butilato de hidroxitolueno, que age protegendo os espermatozoides contra danos causados durante a criopreservação, além de melhorar a motilidade, integridade das membranas plasmática e acrossomal pós-descongelção (ROCA et al., 2004), e a trealose, que interfere diretamente nas membranas aumentando a sua fluidez antes da congelação, gerando uma maior resistência dos espermatozoides contra danos causados pelo processo de criopreservação e descongelção (HU et al., 2010).

Os antioxidantes são agentes que quebram a cadeia da reação oxidativa, em geral agem eliminando, limpando ou suprimindo a formação de espécies reativas de oxigênio ou se opõem a suas ações, de modo geral reduzindo o estresse oxidativo (BANSAL; BILASPURI, 2011). A adição de antioxidantes ao meio diluidor pode ser indicado antes do processo de criopreservação para proteger os espermatozoides contra danos oxidativos, resultando numa melhor motilidade, e em maior número de espermatozoides não capacitados e viáveis (GADEA et al., 2005; BANSAL; BILASPURI, 2011).

3.5. Protocolo de Congelação

3.5.1. Coleta

A coleta do sêmen pode se processar de duas maneiras: eletroejaculador ou vagina artificial (TERRILL, 1940). A coleta por eletroejaculador se dá pela introdução de uma sonda bipolar no reto do animal. Durante dois a quatro segundos é aplicada uma voltagem com intervalos de 10 a 20 segundos até que o animal ejacule. Trata-se de método estressante para o animal, além de, durante esse processo pode ocorrer problemas de contaminação do sêmen com urina. Sua vantagem é a obtenção de sêmen de um grande número de animais, independente do desejo sexual dos mesmos (AX et al., 2004b; MARCO-JIMÉNEZ et al., 2005).

Ao contrário do eletroejaculador, o uso da vagina artificial é menos estressante para o animal, pois se trata de um tubo rígido de PVC de 20 cm de comprimento aproximadamente e 5 cm de diâmetro, revestida por uma mucosa de borracha, e que reproduz o ambiente genital feminino. Ela deve estar abastecida de água no momento da coleta na temperatura entre 40 e 45 °C e com a pressão adequada, oferecendo condições ideais para que o animal ejacule no copo coletor que fica acoplado no final da vagina artificial (AX et al., 2004b).

Terril (1940) constatou que na coleta de sêmen utilizando a vagina artificial, o ejaculado possui um volume menor e mais concentrado quando comparado com a coleta utilizando o eletroejaculador, além de diminuir a possibilidade de contaminação do sêmen com urina.

De acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998) o sêmen deve ter suas características macroscópicas (odor, cor, volume) e microscópicas (motilidade total e progressiva, vigor, concentração e turbilhonamento) analisadas logo após a coleta.

3.5.2. Diluição

A taxa de diluição do sêmen é determinada pelo volume do ejaculado, que varia de acordo com a idade, espécie e individualidade do animal, juntamente com a concentração inicial dos espermatozoides e a motilidade (GRAHAM, 1978).

A diluição deve ser feita para proteger os espermatozoides, preservando suas características e viabilidade, além de aumentar o volume. Pode ser aplicada de três formas: diluir o sêmen a fresco, aumentando o seu volume e o número de doses

inseminantes ou fracioná-lo e resfriá-lo para ser conservado e utilizado em um curto espaço de tempo ou congelá-lo para que seja utilizado após períodos longos de criopreservação (REICHENBACH et al., 2008).

Os diluidores utilizados devem manter a pressão osmótica e o balanço eletrolítico, manter o pH estável, proteger os espermatozoides contra os efeitos prejudiciais do resfriamento e da congelação, aumentar o volume do sêmen a fim de multiplicar o número de inseminações, proporcionar um meio para que o espermatozoide possa continuar seu metabolismo e tentar manter a fertilidade após resfriamento e congelação do sêmen (GRAHAM, 1978; HAFEZ, 2004).

3.5.3. Etapas de resfriamento, congelação e descongelação

A sobrevivência do espermatozoide no plasma seminal é limitada por poucas horas e para mantê-lo viável por mais tempo se faz necessária a utilização de biotécnicas como a criopreservação (HAFEZ, 2004).

A técnica da congelação do sêmen abrange os processos de diluição, resfriamento, congelação e armazenamento a -196°C e descongelação (BAILEY et al, 2008).

O resfriamento foi criado inicialmente para manter os espermatozoides viáveis armazenados a uma temperatura de 5°C , diminuindo a taxa metabólica dos mesmos (VISHWANATH; SHANNON, 2000). Este procedimento pode ser feito de forma doméstica, sendo que o sêmen após o envase é colocado em tubos de ensaio e levados a geladeira dentro de beakers contendo água a 37°C , onde permanece até atingir a temperatura de 4°C . Esse tipo de resfriamento requer bastante rigor no controle da curva da queda de temperatura, para não lesionar as a membrana plasmática dos espermatozoides (FIGUERÊDO, 2006). Pois é durante esse período que ocorre o choque térmico, associado a perda de colesterol e desestabilização da membrana, iniciando precocemente a capacitação espermática (BAILEY et al, 2008).

Durante a criopreservação os espermatozoides sofrem alterações osmóticas na glicerolarização, congelação e descongelação (BAILEY et al, 2008), necessitando que haja um tempo de equilíbrio para que os espermatozoides se adaptem ao meio, havendo o equilíbrio osmótico a fim de reduzir os efeitos prejudiciais da formação de

gelo durante o processo de congelação e descongelação (VISHWANATH; SHANNON, 2000).

A congelação de sêmen implica na parada completa no processo de metabolismo da célula, com a função de conservá-la por um longo período de tempo (VISHWANATH; SHANNON, 2000).

Existem dois tipos diferentes de curva de congelação que podem lesionar a célula: curvas muito lentas, as células podem ser prejudicadas por ficarem expostas a uma alta concentração de soluto por um longo período, ou curva rápida, as células sofrem pela rapidez da queda de temperatura, formando macrocristais de gelo no seu interior que irão lesionar a membrana (FISER et al., 1986).

Fora das centrais de congelação, sem os equipamentos apropriados, se torna difícil padronizar as curvas de resfriamento e congelação, pois os materiais e metodologias utilizados variam de cada profissional, podendo alterar os resultados. Nos últimos anos vem surgindo equipamentos automatizados que proporcionam curvas de temperatura programáveis e homogêneas, a fim de tornar o processo de criopreservação estável e padronizado, propiciando menos danos aos espermatozoides (LIMA, 2008).

Azevedo et al. (2005) em seu experimento testou duas curvas de congelação para sêmen de carneiros da raça Santa Inês. A primeira consistia em resfriar o sêmen a 0,25°C/min até 5°C, mantê-lo nessa temperatura até completar 120 min e submetê-lo à congelação a 20°C/min até atingir -120°C e a segunda consistia em resfriar o sêmen a 0,5°C/min até 5°C, mantê-lo nessa temperatura até completar 90 min e submetê-lo à congelação em duas fases: 15°C/min e 10°C/min até atingir -120°C. Ambas curvas utilizaram o equipamento TK 3000®. Ao final do experimento, os autores concluíram que todas as curvas preservaram o sêmen de forma semelhante.

Os espermatozoides congelados-descongelados apresentam uma acelerada taxa de capacitação, diminuindo dessa forma a vida útil dessas células (CURRY, 2000).

A descongelação do sêmen irá depender da velocidade de congelação. As amostras congeladas numa curva lenta ou moderada devem ser descongeladas de maneira lenta, para possibilitar que as células espermáticas sejam hidratadas lentamente até atingir o volume inicial, além de impedir que os cristais de gelo

descongelem rapidamente e invadam as células, levando ao aumento celular e danos à membrana plasmática (MELO, 2003).

Os espermatozoides armazenados a -79°C no gelo seco ou a -196°C no nitrogênio líquido podem se manter viáveis por um período de tempo indeterminado (VISHWANATH; SHANNON, 2000). O armazenamento de sêmen a longo prazo, traz vantagens aos produtores de animais e a indústria de IA, tendo em vista que: o sêmen criopreservado facilita a disseminação de genes desejáveis, aumenta rapidamente a produtividade do rebanho, diminui a transmissão de doenças sexualmente transmissíveis, possibilita o uso do sêmen de animais mortos ou inválidos, além de proporcionar a formação de banco de germoplasma e utilização do esperma em linhagens transgênicas (BAILEY et al, 2000; 2008).

3.6. Avaliação do sêmen pós-descongelção

Várias características espermáticas são testadas laboratorialmente, tais como, motilidade, viabilidade, modificações estruturais e bioquímicas das membranas espermáticas na tentativa de predizer “in vitro” o potencial fértil de uma amostra de sêmen congelado. Porém, isoladamente esses testes não possuem grande confiabilidade, sendo atribuída uma maior precisão na avaliação dos espermatozoides quando mais de um teste laboratorial é utilizado (AX et al., 2004a).

3.6.1. Motilidade e vigor

São testes utilizados na rotina da avaliação de sêmen. Para sêmen ovino uma amostra é descartada quando apresenta menos que 30% de motilidade progressiva (escala de 0-100%) e vigor menor que três (escala de 0-5), pós-descongelção (CBRA, 1998).

Esses testes consistem em uma avaliação subjetiva, feita ao microscópio, podendo também apresentar desvantagens devido à estimativa variar entre examinadores por causa de diversos motivos, inclusive falta de prática de avaliação de sêmen (TONIETO, 2008). Por isso, nos grandes centros de pesquisa e em centrais de congelação de sêmen, está virando rotina o uso de análise computadorizada de sêmen – CASA (Computer Assisted Sperm Analysis).

O CASA é capaz de avaliar a motilidade, velocidade e viabilidade espermática de forma mais objetiva (HIDALGO, et al., 2005; ROBAYO et al., 2008). Trata-se de uma técnica precisa para ser utilizada na análise da cinemática dos espermatozoides, deve-se ter cuidado na preparação das amostras para que não haja erro de leitura, levando em consideração que amostras abaixo de 20×10^6 e acima de 50×10^6 podem apresentar resultados imprecisos (KUMAR et al., 2009).

3.6.2. *Morfologia espermática*

As alterações morfológicas dos espermatozoides são classificadas em defeitos maiores e menores. Defeitos maiores estão associados ao maior prejuízo no potencial fecundante do espermatozoide, enquanto os defeitos menores trazem menos prejuízos sobre a fertilidade (BARTH; OKO, 1989).

A aplicação do teste pode ser a partir do esfregaço de células espermáticas em lâminas de microscopia, utilizando-se coloração específica, ou por preparação úmida, com fixação da amostra em solução salina de formol ou glutaraldeído e avaliação de uma gota da amostra sob lâmina e lamínula em microscopia de contraste de fase (AX et al., 2004a).

Na avaliação morfológica do sêmen ovino pós-descongelamento, a amostra estará dentro do padrão quando apresentar menos de 20% de defeitos totais e menos de 10% de defeitos maiores (CBRA, 1998), sendo cauda dobrada e/ou enrolada os defeitos mais comuns encontrados em amostras espermáticas pós-descongelamento, levando os espermatozoides a movimentarem-se circularmente. Segundo AX et al. (2004a) existe, nessa espécie, uma correlação positiva entre espermatozoides morfolologicamente normais e motilidade espermática.

3.6.3. *Teste de termorresistência*

A manutenção da viabilidade e motilidade por um determinado período de tempo após a descongelamento é avaliado pelo teste de termorresistência (TTR). Amostras de sêmen após diluição, resfriamento e congelamento são mantidas em banho-maria a 38°C , sendo realizadas avaliações de motilidade espermática e vigor a cada hora, até o tempo final do TTR. O teste de termorresistência pode ser

classificado em dois: TTR rápido (5 a 30 min) e TTR lento (2 a 5h), podendo variar de acordo com a espécie em que será aplicado este teste (CBRA, 1998). Colas (1975) sugere para a espécie ovina que o ensaio “*in vitro*” utilizando incubação durante o período de três horas após a descongelação dá uma ideia exata da qualidade do sêmen.

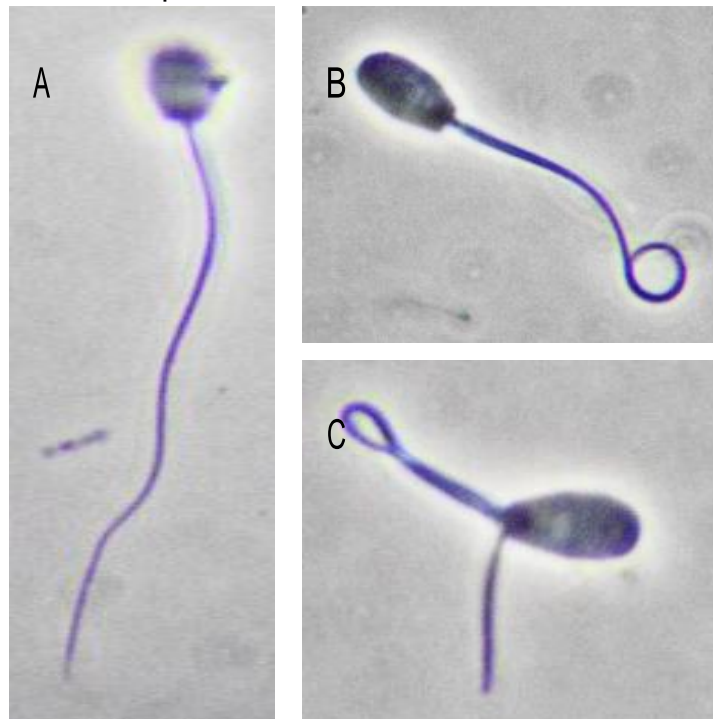
3.6.4. Teste hiposmótico

Baseia-se em submeter um espermatozoide ao estresse de ser colocado em uma solução com osmolaridade menor do que a encontrada em seu interior, onde haverá um balanço entre o meio interno e externo (JEYENDRAN et al., 1984).

Estudos mostram que a osmolaridade da solução utilizada no teste pode variar entre 50 e 300 mOsm/L a depender da espécie a qual o sêmen analisado pertença (JEYENDRAN et al., 1984; OBERST et al., 2003; FONSECA, et al., 2005; MOURA et al., 2010; QUINTELA et al., 2010).

Na execução do teste é levada em consideração a reação de enrolamento e/ou dobramento da cauda (Figura 3), sendo considerada como uma reação positiva ao teste, caracterizando a integridade funcional da membrana, que é de fundamental importância para o funcionamento da célula espermática, sendo um dos requisitos mínimos para o processo de fertilização (OBERST et al., 2003; MOURA et al., 2010), podendo ser usado como indicador da habilidade fertilizante do espermatozoide (JEYENDRAN et al., 1984). Essas formas reativas são facilmente visualizadas através da microscopia óptica comum e de fase, na objetiva de imersão em aumento de 1000X, sendo necessária a contagem de apenas 100 células para que o teste tenha validade (MELO; HENRY, 1999).

Figura 3 - Teste hiposmótico em sêmen ovino



Fonte: O autor.

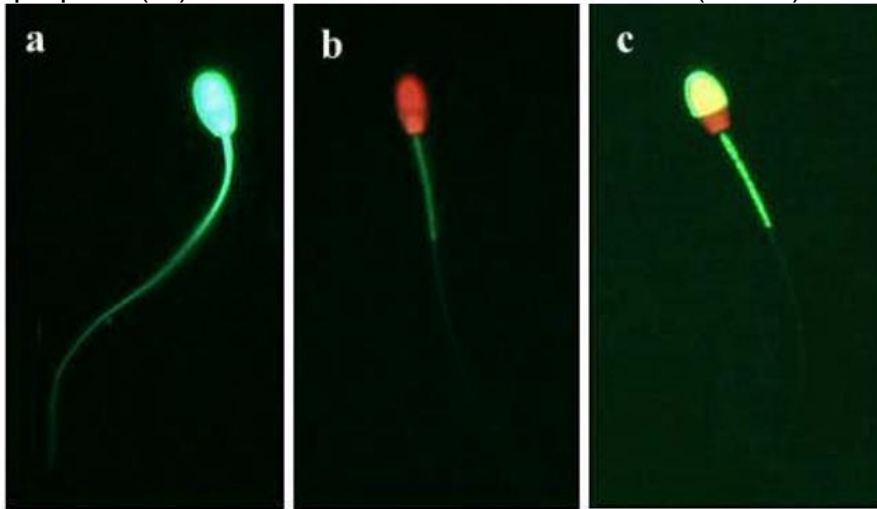
(A) Espermatozoide não reativo ao teste e (B e C) Espermatozoides reativos ao teste (Microscópio de contraste de fase, 1000X).

3.6.5. Sondas fluorescentes

O Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e o Iodeto de Propídeo (PI) são sondas fluorescentes utilizadas no teste para avaliar a integridade estrutural da membrana do espermatozoide (HARRISON; VICKERS, 1990).

O mecanismo de ação do CFDA se dá através de sua penetração na célula que possui a membrana íntegra, reagindo dentro do acrossomo e mitocôndria, bem como em todo o citoplasma gerando uma fluorescência verde (Figura 4), sendo percebido também em toda a extensão da cauda. Já o PI irá corar o DNA (ácido desoxirribonucléico) celular de espermatozoides que possuem a membrana lesada, pois esse corante não consegue ultrapassar a membrana plasmática íntegra. Ao interagir com o DNA esse corante irá emitir uma fluorescência vermelha (Figura 4). A observação das reações dos corantes com as células se dá através do microscópio de fluorescência, permitindo a avaliação direta das mesmas (HARRISON; VICKERS, 1990).

Figura 4 - Espermatozoides corados pela associação das sondas fluorescentes iodeto de propídio (PI) e diacetato de carboxifluoresceína (CFDA).



Fonte: Silva, 2011.

a) Íntegros: membranas plasmática e acrossomal íntegras; b) Lesados: membranas plasmática e acrossomal lesadas; c) Semi-lesados: membranas plasmática lesada e acrossomal íntegra.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Post-thaw Quality of Ram Sperm Frozen with Different Concentrations of Glycerol and Low-density Lipoprotein, Associated with Non-enzymatic Antioxidants

1 Article

2 **Post-thaw Quality of Ram Sperm Frozen with Different Concentrations of**
3 **Glycerol and Low-density Lipoprotein, Associated with Non-enzymatic**
4 **Antioxidants**

5 **Paola P. N. Snoeck¹, Diogo R. Câmara^{2*}, Luís C. O. Moura¹, Maíra C. da Silva¹,**
6 **Mariana Machado-Neves³, Milton R. Teixeira-Neto⁴ and Marc Henry⁵**

7 ¹Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais da Universidade Estadual de
8 Santa Cruz – UESC, Ilhéus-BA, Brasil

9 ²Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Alagoas –
10 UFAL, Viçosa-AL, Brasil

11 ³Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa-
12 MG, Brasil

13 ⁴Departamento de Medicina Veterinária, Centro Universitário UNIFTC, Vitória da
14 Conquista – BA, Brasil

15 ⁵Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Universidade Federal de Minas
16 Gerais – UFMG, Belo Horizonte-MG, Brasil

17 * Correspondence: Author to whom correspondence should be addressed. email:
18 diogo@vicosa.ufal.br

19 **Simple Summary:** Ram sperm cryopreservation has been performed for several
20 years, but post-thaw quality and fertility after artificial insemination still need to be
21 improved. Low-density lipoproteins (LDL) were reported as the active compound of
22 egg yolk protecting sperm against the cold shock. However, oxidative stress is
23 generated during in vitro manipulation, which requires the use of antioxidant
24 compounds to preserve sperm viability. Thus, we aimed to evaluate the effect of
25 LDL associated with non-enzymatic antioxidants on post-thaw sperm quality.
26 Results showed an increment of post-thaw sperm quality by using LDL instead of
27 egg yolk. The addition of hydroxytoluene butylate to the LDL extender better
28 sustained the sperm motility during post-thaw incubation.

29 **Abstract:** The cryopreservation process induces reduction on ram sperm quality,
30 decreasing the pregnancy rate of ewes inseminated with thawed sperm. Hence, we
31 aimed to improve the post-thaw quality of ram sperm evaluating 1) the influence of
32 replacing 16% egg yolk by different concentrations of LDL (2, 8, or 16%) on Tris-

33 Glucose extender with three concentrations of glycerol (3, 5, or 7%); 2) if the
34 addition of non-enzymatic antioxidants (ascorbic acid, hydroxytoluene butylate,
35 ascorbyl palmitate, and trehalose) to the extender is beneficial to ram sperm frozen
36 in a medium with 5% glycerol and 2% or 8% LDL. Semen samples were collected
37 from six Santa Inês rams, split into different treatments, and frozen. After thawing,
38 kinematic (CASA), structural (propidium iodide and carboxyfluorescein diacetate)
39 and functional (hypoosmotic test) sperm membrane integrity was assessed. Total
40 motility, VCL, and LIN were also assessed in thawed samples during 3 h of
41 incubation (38 °C). In conclusion, replacing egg yolk for LDL improved post-thaw
42 sperm quality. While hydroxytoluene butylate was able to better sustain ram sperm
43 motility during incubation, ascorbyl palmitate displayed toxicity and impaired sperm
44 motility.

45 **Keywords:** ascorbyl palmitate; cryopreservation; lipoprotein; sheep; spermatozoa

46

47 **Introduction**

48 The effectiveness of transcervical artificial insemination (AI) in sheep using
49 frozen-thawed semen is still low, as after cryopreservation sperm present low viability
50 and reduced longevity in the female reproductive tract [1-4]. The damages observed
51 in frozen-thawed ram sperm involve changes in cell structure and function that
52 negatively impact fertility [5]. Among cryoinjuries, it is possible to highlight the lipid
53 transition phase of the cell membrane at low temperatures [6], the oxidative stress
54 generated by the imbalance between the production of reactive oxygen species
55 (ROS) and efficiency of the antioxidant defense system [7], and the osmotic stress
56 during the freezing and thawing process [8,9].

57 Different components have been added to semen extenders to improve the
58 quality of frozen-thawed spermatozoa [5,10]. Over the last decades, lyophilized egg
59 yolk, plasma egg yolk, and low-density lipoprotein (LDL) have been successfully
60 used for ram semen cryopreservation [3,11,12]. Egg yolk replacement by LDL in
61 semen extenders has shown similar or superior cryoprotective effects in frozen-
62 thawed spermatozoa from several species[3,11-20]. Overall, LDL favors sperm
63 membrane stabilization by adding cholesterol molecules, protecting the membrane
64 from lipid peroxidation and increasing the activity of enzymatic antioxidants in thawed
65 sperm [14,18,19,21-23].

66 Furthermore, oxidative stress has been considered one of the major causes of
67 male infertility [24]. Sperm membranes are enriched with polyunsaturated fatty acids
68 [5,24] that are easily oxidized by free radicals and peroxides, reducing the motility
69 and activating the apoptotic process that might culminate with DNA fragmentation
70 [25-27]. Although ROS generation is primarily required for physiological signaling
71 pathways, a precise balance between its production and scavenging is crucial for
72 sperm viability [25,26,28]. Therefore, the addition of antioxidants to the extender
73 during semen cryopreservation has been tested in several species to improve semen
74 quality, including sheep [29-33].

75 This study aimed to evaluate the protective effect of non-enzymatic antioxidants
76 added into LDL extenders on sperm quality after the freezing-thawing process. For
77 this purpose, we primarily tested the best concentration of both glycerol and LDL in
78 Tris-Glucose extender (Experiment I). Based on the results of Experiment I, two
79 extenders were selected and used in two other Experiments (II and III), to evaluate
80 the influence of adding non-enzymatic antioxidants (ascorbic acid, ascorbyl palmitate,
81 hydroxytoluene butylate, and trehalose) on the post-thaw sperm quality.

82 Material and Methods

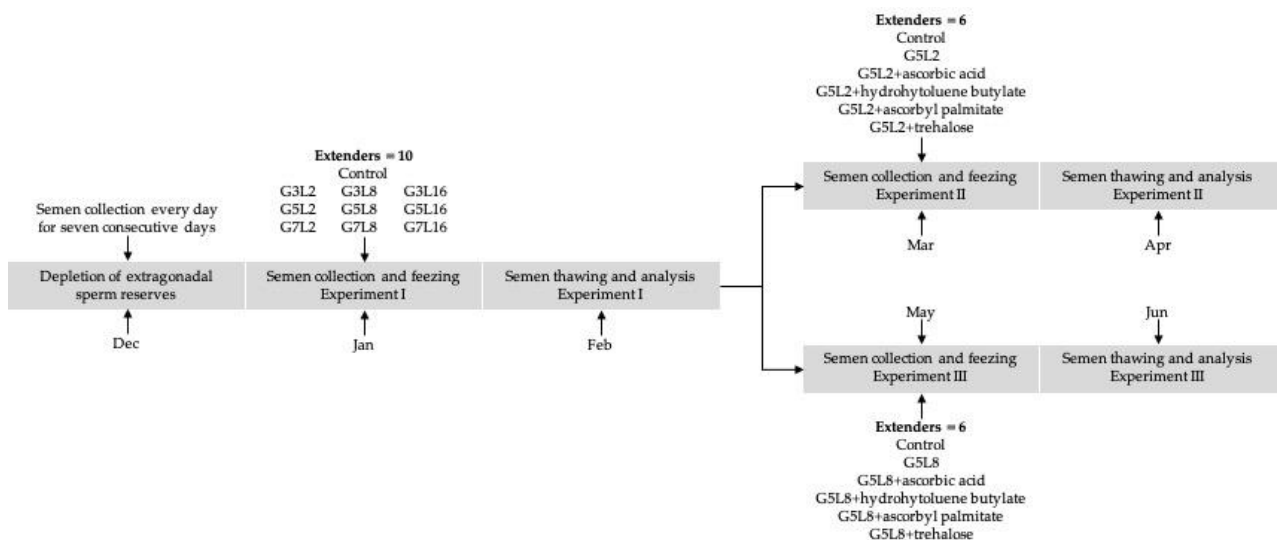
83 Ethics Statement

84 All the experimental protocols and animal care were approved by the
85 Commission of Ethics in Animal Experimental of the State University of Santa Cruz
86 (Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC, Bahia, Brazil), approval number n.
87 007/10.

88 Animals, semen collection and evaluation

89 Six Santa Inês rams (2-5 years of age), a Brazilian hair breed with a low degree
90 of reproductive seasonality [34], were used in the present experiment. The animals
91 were at Belo Horizonte, Brazil (19° 48' 57" south, 43° 57' 15" west) with uniform
92 feeding, housing, and lighting conditions. Before the beginning of the Experiments,
93 extra-gonadal sperm reserves were depleted [11], and the animals were under
94 regular semen collection three times/week using an artificial vagina, during the whole
95 experimental period (Figure 1). Minimal requirements to freeze ejaculates were:
96 volume \geq 0.5 mL, motility \geq 75%, mass motility \geq 3, morphologically normal sperm \geq
97 70%, and a minimum of $\geq 1,8 \times 10^9$ sperm/ejaculate.

98



99 **Figure 1:** Schematic depiction of the study design. For all experiments, three ejaculates
 100 from six Santa Inês rams were collected with an artificial vagina and individually split into
 101 extenders tested, to a final concentration of 100×10^6 motile sperm/mL. Tris-glucose base
 102 extender containing 16% egg yolk and 5% glycerol was used as Control. For Experiment I, a
 103 base extender with no egg yolk and different glycerol (G3, 5, or 7%) and low-density
 104 lipoprotein (L2, 8, or 16%) concentrations were used. For Experiments II and III, 10 mM of
 105 antioxidants were added in the extenders selected based on the results of Experiment I
 106 (G5L2 and G5L8, respectively).

107 *Extenders*

108 Tris-Glucose extender was used as the base extender medium and was
 109 composed of 3.69 gTris, 1.99 g citric acid, 0.5 g glucose, 100 mg streptomycin,
 110 100,000 UI penicillin, and bi-distilled water (qsp 100 mL). When 16% egg yolk (v:v)
 111 and 5% glycerol (v:v) were added, it was named Control (C, 1,241 mOsmol/L).

112 Experiment I aimed to evaluate the influence of different LDL and glycerol
 113 concentration on post-thaw sperm quality. The extraction of LDL from hen's egg yolk
 114 was performed according to Neves et al. [17]. Each ejaculate from individual rams
 115 was split into 10 different extenders: C (Control); G3L2 (Tris-Glucose + glycerol (3%)
 116 + LDL (2%), 774 mOsmol/L), G5L2 (Tris-Glucose + glycerol (5%) + LDL (2%), 1,208
 117 mOsmol/L), G7L2 (Tris-Glucose + glycerol (7%) + LDL (2%), 1,506 mOsmol/L),
 118 G3L8 (Tris-Glucose + glycerol (3%) + LDL (8%), 766 mOsmol/L), G5L8 (Tris-Glucose
 119 + glycerol (5%) + LDL (8%), 1,165 mOsmol/L), G7L8 (Tris-Glucose + glycerol (7%) +
 120 LDL (8%), 1,492 mOsmol/L), G3L16 (Tris-Glucose + glycerol (3%) + LDL (16%), 848
 121 mOsmol/L), G5L16 (Tris-Glucose + glycerol (5%) + LDL (16%), 1,170 mOsmol/L), and
 122 G7L16 (Tris-Glucose + glycerol (7%) + LDL (16%), 1,481 mOsmol/L).

123 Based on the results of Experiment I, two extenders were selected and used in
 124 Experiments II and III, in which different non-enzymatic antioxidants were added:
 125 ascorbic acid (AA), hydroxytoluene butylate (HB), ascorbyl palmitate (AP), and
 126 trehalose (TH). In both experiments (II and III), each ejaculate from individual rams
 127 was split into different extenders tested and all antioxidants were added to a final

128 concentration of 10 mM. For Experiment II, the quality of post-thaw ram sperm was
129 assessed using the following extenders: Control (C), G5L2, G5L2 + AA(985
130 mOsmol/L), G5L2 + HB (971 mOsmol/L), G5L2 + AP (975 mOsmol/L), and G5L2 +
131 TH (998 mOsmol/L). For Experiment III, the following extenders were used: C, G5L8,
132 G5L8 + AA(1,099 mOsmol/L), G5L8 + HB (1,093 mOsmol/L), G5L8 + AP (1,098
133 mOsmol/L), and G5L8 + TH (1,114 mOsmol/L).

134 *Semen cryopreservation and thawing*

135 Semen samples were diluted in their respective treatments for each experiment
136 with a final concentration of 100×10^6 motile sperm/mL. Extended semen samples
137 were packed into 0.25 mL straws (IMV Technology, L'Aigle, Cedex, France),
138 immediately cooled to 5 °C at a rate of -0.25 °C/min, maintained at 5 °C for 2 h,
139 thereafter a freezing rate of -25 °C/min was used from 5 to -140 °C using the
140 equipment TK4000® (TK Tecnologia, Uberaba, MG, Brazil). Upon reaching -140 °C
141 the straws were transferred to liquid nitrogen (-196 °C) and stored until evaluation.

142 *Post-thaw sperm evaluation*

143 All samples were thawed at 38 °C for 30 s and kept in a water bath for 5 min
144 before analysis. The sperm were evaluated for kinematics (Computer Assisted
145 Sperm Analysis, CASA, SCA®, v.4, Microptics S.L., Barcelona, Spain), functional
146 integrity of plasma membrane (Hypoosmotic Swelling Test, HOST), and structural
147 integrity of plasma and acrosomal membranes (propidium iodide and
148 carboxyfluorescein diacetate, PI/CFDA).

149 Before CASA analysis, thawed samples were diluted in Cmedia (38 °C) to obtain
150 a final concentration of 50×10^6 sperm/mL. The following endpoints were determined:
151 total motility (TM, %), progressive motility (PM, %), curvilinear velocity (VCL, $\mu\text{m/s}$),

152 progressive velocity (VSL, $\mu\text{m/s}$), path velocity (VAP, $\mu\text{m/s}$), linearity (LIN, %), and
153 amplitude of lateral head displacement (ALH, $\mu\text{m/s}$). Kinematic endpoints were
154 measured with the following settings: particle area 9–70 μm ; progressivity >80% of
155 STR; circular < 50% LIN; 25 images/s. At least three randomly selected microscopic
156 fields were scanned. A minimum of 500 sperm/treatment were recorded.

157 For the HOST analysis, aliquots (25 μL) of each sample were diluted in 200 μL of
158 fructose- citrate solution (100 mOsmol/L). After 30 min of incubation (38 °C) the
159 samples were fixed with formalin-buffered saline (300 μL) and 100 sperm were
160 evaluated ($\times 1000$ magnification; Olympus® BX 41). The percentage of reactive cells
161 was calculated according to Melo and Henry [35]. Structural integrity of plasma and
162 acrosomal membranes was determined according to Harrison and Vickers [36].
163 Under an epifluorescence microscope ($\times 400$ magnification; Olympus® CX 51) 200
164 sperm/treatment were evaluated. Staining with CFDA was assessed using the
165 standard fluorescein filter set while staining with PI was assessed using the standard
166 rhodamine filter set. Cells were classified into three subpopulations: intact (plasma
167 and acrosomal membranes integrity, PI⁻CFDA⁺), partially intact (plasma membrane
168 damaged and intact acrosome, PI⁺CFDA⁺), damaged (both plasma and acrosomal
169 membranes damaged, PI⁺CFDA⁻). To evaluate the effectiveness of the treatments
170 only the percentage of intact sperm was considered.

171 Finally, after thawing, aliquots of all the samples from the Experiments I, II, and III
172 were maintained in a dry bath (38 °C), and total motility, VCL, and LIN were
173 assessed by CASA after 1, 2, and 3 h of incubation, to determine sperm longevity
174 during incubation.

175 *Statistical analysis*

176 The Experiments were designed in randomized blocks, with six blocks (rams)
177 and ten (Experiment I) or six (Experiments II and III) treatments. For all Experiments,
178 each ejaculate from each ram was split into different extenders tested, with three
179 repetitions (ejaculates). The results were grouped, totaling 18
180 samples/treatment/Experiment. Analysis of variance (ANOVA) was performed and
181 the means were compared using Duncan's test. Data homoscedasticity (Levene's
182 test) and normality were assessed (Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests).
183 Data not normally distributed were arcsine transformed before analysis. Data are
184 presented non-transformed (mean \pm SEM). A probability of $P < 0.05$ was considered
185 significant.

186 **Results**

187 *Experiment I*

188 Thawed sperm frozen in the extender G5L2 showed the highest percentage of
189 total and progressive motility, being superior to C and G7L2 in both endpoints ($P <$
190 0.05 ; Table 1). The progressive motility of thawed sperm in the extender G3L16 was
191 also higher than C and G7L2 ($P < 0.05$; Table 1).

192 Overall, the percentage of total motility decreased after 3 h of incubation
193 compared to total motility evaluated at 0 h post-thawing. However, this reduction was
194 significant in the extenders G5L2, G7L2, G3L8, G3L16, and G5L16. It is noteworthy
195 that after incubation, all extenders tested resulted in similar total motility ($P > 0.05$;
196 Table 2).

197

198 **Table 1.** Post-thaw kinematic parameters of ram sperm (mean \pm SEM)
 199 frozen in Tris-glucose base extender containing 16% egg yolk and 5%
 200 glycerol (Control) or using base extender with no egg yolk and different
 201 glycerol (G3, 5, or 7%) and low-density lipoprotein (L2, 8, or 16%)
 202 concentrations.

| Extender | Parameters | | | | | | |
|----------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| | TM (%) | PM (%) | VCL ($\mu\text{m/s}$) | VSL ($\mu\text{m/s}$) | VAP ($\mu\text{m/s}$) | LIN (%) | ALH (μm) |
| Control | 22.6 \pm 2.0 ^b | 4.1 \pm 0.8 ^b | 33.0 \pm 1.6 ^c | 12.3 \pm 1.2 ^b | 17.4 \pm 1.3 ^b | 36.2 \pm 1.9 ^b | 2.3 \pm 0.2 ^b |
| G3L2 | 32.8 \pm 2.9 ^{ab} | 10.9 \pm 1.8 ^{ab} | 42.7 \pm 1.7 ^{ab} | 20.1 \pm 1.9 ^{ab} | 26.6 \pm 2.0 ^{ab} | 45.5 \pm 2.7 ^{ab} | 2.8 \pm 0.1 ^a |
| G5L2 | 48.1 \pm 5.8 ^a | 15.5 \pm 3.4 ^a | 41.6 \pm 2.1 ^{ab} | 19.2 \pm 2.0 ^{ab} | 26.0 \pm 2.3 ^{ab} | 44.3 \pm 2.3 ^{ab} | 2.6 \pm 0.1 ^{ab} |
| G7L2 | 23.2 \pm 1.6 ^b | 4.0 \pm 0.4 ^b | 34.4 \pm 1.4 ^{bc} | 13.4 \pm 0.9 ^{ab} | 19.2 \pm 1.1 ^{ab} | 38.4 \pm 1.6 ^{ab} | 2.5 \pm 0.1 ^{ab} |
| G3L8 | 30.8 \pm 2.3 ^b | 10.3 \pm 1.2 ^{ab} | 44.2 \pm 1.6 ^a | 20.6 \pm 1.6 ^{ab} | 26.7 \pm 1.7 ^{ab} | 45.3 \pm 2.2 ^{ab} | 2.7 \pm 0.1 ^{ab} |
| G5L8 | 34.2 \pm 3.3 ^{ab} | 11.1 \pm 2.4 ^{ab} | 44.1 \pm 2.2 ^a | 19.1 \pm 1.8 ^{ab} | 26.0 \pm 1.9 ^{ab} | 42.1 \pm 1.8 ^{ab} | 2.9 \pm 0.1 ^a |
| G7L8 | 34.0 \pm 4.1 ^{ab} | 12.5 \pm 3.3 ^{ab} | 42.7 \pm 2.7 ^{ab} | 19.5 \pm 2.3 ^{ab} | 26.6 \pm 2.5 ^{ab} | 43.4 \pm 2.5 ^{ab} | 2.5 \pm 0.1 ^{ab} |
| G3L16 | 35.5 \pm 3.8 ^{ab} | 13.9 \pm 2.8 ^a | 45.8 \pm 2.2 ^a | 22.2 \pm 2.0 ^a | 28.4 \pm 2.0 ^a | 47.4 \pm 2.1 ^a | 2.7 \pm 0.1 ^{ab} |
| G5L16 | 31.3 \pm 2.5 ^b | 11.8 \pm 2.2 ^{ab} | 44.8 \pm 2.4 ^a | 21.8 \pm 2.2 ^a | 27.7 \pm 2.3 ^a | 46.9 \pm 2.5 ^{ab} | 2.7 \pm 0.1 ^{ab} |
| G7L16 | 28.6 \pm 2.3 ^b | 10.4 \pm 1.9 ^{ab} | 44.4 \pm 2.2 ^a | 20.1 \pm 1.6 ^{ab} | 26.2 \pm 1.6 ^{ab} | 44.5 \pm 1.8 ^{ab} | 2.9 \pm 0.1 ^a |

203 TM: total motility; PM: progressive motility; VCL: curvilinear velocity; VSL: progressive
 204 velocity; VAP: path velocity; LIN: linearity; ALH: amplitude of lateral head displacement.
 205 Within columns, means with no common superscript letters are different ($P < 0.05$).

206 Lower VCL post-thaw was observed in sperm frozen in the extender G7L2 and
 207 Control. After 3 h of incubation, the association of higher concentrations of glycerol
 208 (5% and 7%) with LDL (8 and 16%) and the extender G5L2 were superior to control
 209 ($P < 0.05$). A reduction in VCL after incubation was observed in extenders C, G3L2,
 210 and G3L8 ($P < 0.05$; Table 2). All extenders tested resulted in similar LIN ($P > 0.05$)
 211 after incubation, with a reduction in LIN caused by incubation only noticed in
 212 extenders with 8 and 16% LDL ($P < 0.05$; Table 2).

213 The addition of different concentrations of LDL to replace 16% egg yolk, as well
 214 as the use of glycerol at 3, 5, and 7% did not enhance the sperm structural integrity
 215 (PI-CFDA⁺) compared with C ($P > 0.05$). By contrast, the functional integrity of sperm
 216 membrane was better preserved in extenders containing 2% LDL, regardless of
 217 glycerol concentration, as well as in the G7L8 extender (Figure 2).

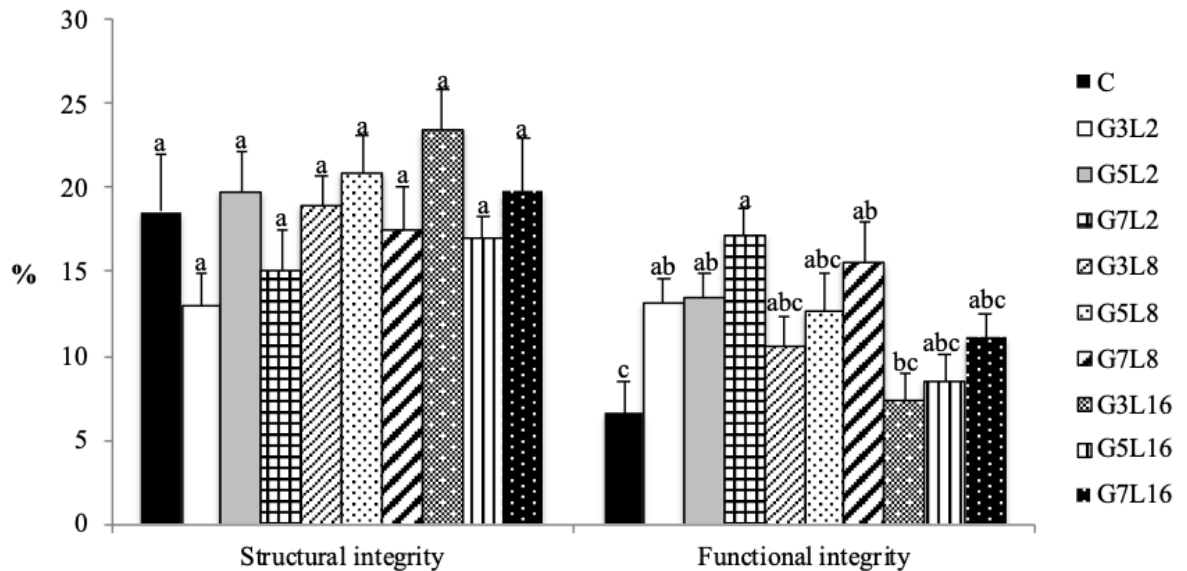
218

219 **Table 2.** Kinematic parameters of ram sperm (mean \pm SEM) frozen in Tris-
 220 glucose base extender containing 16% egg yolk and 5% glycerol (Control) or
 221 using base extender with no egg yolk and different glycerol (G3, 5, or 7%)
 222 and low-density lipoprotein (L2, 8, or 16%) concentrations during 3h of
 223 incubation at 38 °C after thawing.

| | Extender | Incubation time | | | |
|------------------|----------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | 0h | 1h | 2h | 3h |
| TM (%) | Control | 22.6 \pm 2.0 ^b | 22.2 \pm 3.1 ^b | 18.2 \pm 2.4 ^b | 15.6 \pm 1.6 ^a |
| | G3L2 | 32.8 \pm 2.9 ^{ab} | 33.4 \pm 2.5 ^{ab} | 26.7 \pm 3.6 ^{ab} | 22.0 \pm 2.9 ^a |
| | G5L2 | 48.1 \pm 5.8 ^a | 41.6 \pm 5.2 ^a | 33.3 \pm 4.2 ^a | 25.6 \pm 3.4 ^{a*} |
| | G7L2 | 23.2 \pm 1.6 ^b | 25.3 \pm 2.0 ^{ab} | 19.3 \pm 0.9 ^{ab} | 18.2 \pm 1.1 ^{a*} |
| | G3L8 | 30.8 \pm 2.3 ^b | 24.4 \pm 1.9 ^{ab} | 20.3 \pm 0.9 ^{ab*} | 17.4 \pm 1.3 ^{a*} |
| | G5L8 | 34.2 \pm 3.3 ^{ab} | 29.5 \pm 3.8 ^{ab} | 29.6 \pm 4.7 ^{ab} | 19.6 \pm 2.8 ^a |
| | G7L8 | 34.0 \pm 4.1 ^{ab} | 28.2 \pm 3.1 ^{ab} | 24.4 \pm 4.0 ^{ab} | 19.5 \pm 1.5 ^a |
| | G3L16 | 35.5 \pm 3.8 ^{ab} | 27.4 \pm 3.2 ^{ab} | 23.0 \pm 1.6 ^{ab} | 19.5 \pm 2.8 ^{a*} |
| | G5L16 | 31.3 \pm 2.5 ^b | 26.8 \pm 3.7 ^{ab} | 21.6 \pm 2.5 ^{ab} | 18.1 \pm 2.2 ^{a*} |
| | G7L16 | 28.6 \pm 2.3 ^b | 27.0 \pm 4.7 ^{ab} | 20.4 \pm 2.3 ^{ab} | 17.6 \pm 3.1 ^a |
| VCL (μ m/s) | Control | 33.0 \pm 1.6 ^c | 30.8 \pm 2.2 ^b | 26.8 \pm 2.0 ^b | 24.1 \pm 1.6 ^{b*} |
| | G3L2 | 42.7 \pm 1.7 ^{ab} | 39.1 \pm 1.1 ^{ab} | 36.9 \pm 1.9 ^a | 32.5 \pm 2.6 ^{ab*} |
| | G5L2 | 41.6 \pm 2.1 ^{ab} | 43.3 \pm 2.3 ^a | 40.2 \pm 2.1 ^a | 35.9 \pm 2.7 ^a |
| | G7L2 | 34.4 \pm 1.4 ^{bc} | 34.8 \pm 1.7 ^{ab} | 32.6 \pm 1.9 ^{ab} | 28.9 \pm 1.3 ^{ab} |
| | G3L8 | 44.2 \pm 1.6 ^a | 41.0 \pm 2.6 ^a | 38.4 \pm 1.7 ^a | 31.0 \pm 1.5 ^{ab*} |
| | G5L8 | 44.1 \pm 2.2 ^a | 44.3 \pm 2.1 ^a | 42.0 \pm 2.8 ^a | 38.0 \pm 4.0 ^a |
| | G7L8 | 42.7 \pm 2.7 ^{ab} | 43.4 \pm 3.9 ^a | 43.1 \pm 4.1 ^a | 35.2 \pm 2.7 ^a |
| | G3L16 | 45.8 \pm 2.2 ^a | 43.4 \pm 3.3 ^a | 40.1 \pm 2.3 ^a | 35.0 \pm 3.5 ^{ab} |
| | G5L16 | 44.8 \pm 2.4 ^a | 44.5 \pm 3.5 ^a | 35.0 \pm 2.5 ^{ab} | 39.4 \pm 3.5 ^a |
| | G7L16 | 44.4 \pm 2.2 ^a | 44.2 \pm 3.4 ^a | 40.1 \pm 4.4 ^a | 37.8 \pm 4.3 ^a |
| LIN (%) | Control | 36.2 \pm 1.9 ^b | 28.9 \pm 3.0 ^b | 24.6 \pm 2.5 ^b | 26.9 \pm 3.5 ^a |
| | G3L2 | 45.5 \pm 2.7 ^{ab} | 39.6 \pm 2.2 ^{ab} | 37.0 \pm 2.6 ^a | 33.5 \pm 3.5 ^a |
| | G5L2 | 44.3 \pm 2.3 ^{ab} | 42.2 \pm 2.5 ^a | 40.5 \pm 2.0 ^a | 38.4 \pm 3.2 ^a |
| | G7L2 | 38.4 \pm 1.6 ^{ab} | 37.6 \pm 2.8 ^{ab} | 37.8 \pm 2.8 ^a | 36.4 \pm 2.0 ^a |
| | G3L8 | 45.3 \pm 2.2 ^{ab} | 37.6 \pm 2.9 ^{ab} | 34.3 \pm 2.7 ^{ab} | 29.0 \pm 2.5 ^{a*} |
| | G5L8 | 42.1 \pm 1.8 ^{ab} | 35.4 \pm 1.5 ^{ab} | 37.3 \pm 2.2 ^a | 32.5 \pm 2.5 ^{a*} |
| | G7L8 | 43.4 \pm 2.5 ^{ab} | 33.1 \pm 2.3 ^{ab} | 31.1 \pm 2.4 ^{ab} | 31.5 \pm 2.8 ^{a*} |
| | G3L16 | 47.4 \pm 2.1 ^b | 34.1 \pm 2.3 ^{ab} | 34.2 \pm 1.5 ^{ab} | 33.7 \pm 2.5 ^{a*} |
| | G5L16 | 46.9 \pm 2.5 ^{ab} | 34.0 \pm 1.8 ^{ab} | 33.3 \pm 2.1 ^{ab} | 32.5 \pm 1.4 ^{a*} |
| | G7L16 | 44.5 \pm 1.8 ^{ab} | 32.0 \pm 1.7 ^{ab} | 30.4 \pm 1.8 ^{ab} | 31.0 \pm 2.0 ^{a*} |

224 Within columns, means with no common superscript letters are different ($P < 0.05$). *
 225 Indicates reduction within treatment during incubation time ($P < 0.05$).

226 Considering the highest TM immediately post-thaw (G5L2) or better TM
 227 stability after 3 h of incubation at 38 °C (G5L8), as well as the ability to
 228 preserve both structural and functional integrity of sperm membranes, these
 229 extenders were selected for Experiments II and III.



230 **Figure 2: Experiment I** ram sperm frozen in Tris-glucose base extender containing 16% egg
 231 yolk and 5% glycerol (Control, C) or using base extender with no egg yolk and different glycerol
 232 (G3, 5, or 7%) and low-density lipoprotein (L2, 8, or 16%) concentrations. Structural (IP-CFDA⁺)
 233 and functional integrity (hypoosmotic test) post-thaw. Different letters indicate differences among
 234 treatments ($P < 0.05$).
 235

236 *Experiment II*

237 The extender containing G5L2+AP presented the lowest total motility
 238 immediately post-thaw ($P < 0.05$), but no difference was observed among other
 239 treatments. The progressive motility of post-thaw spermatozoa was lower in the
 240 extenders G5L2+AP and G5L2+TH when compared to G5L2 and G5L2+ HB ($P <$
 241 0.05), which presented the highest progressive motility, followed by the G5L2+AA
 242 and control extenders. For the remaining kinematic parameters, the extender

243 G5L2+AP showed the lowest values ($P < 0.05$). By contrast, the extender G5L2+HB
244 presented the highest means for VSL, VAP, and LIN (Table 3).

245 Throughout the incubation time at 38 °C, total motility, VCL, and LIN of sperm
246 diluted in the extender G5L2+AP were lower than other treatments and no longer
247 detected at 2 and 3 h. The addition of non-enzymatic antioxidants AA, HB, and TH
248 did not prevent the reduction in the percentage of total motility during 3 h of
249 incubation, as only ram sperm diluted in the extender G5L2 showed no significant
250 reduction in their total motility during incubation. Moreover, the extender G5L2 was
251 better than G5L2+AP or G5L2+TH after 3 h of incubation ($P < 0.05$; Table 4).

252 **Table 3.** Post-thaw kinematic parameters of ram sperm (mean \pm SEM)
253 frozen in Tris-glucose base extender containing 16% egg yolk and 5%
254 glycerol (Control) or using base extender with no egg yolk, 5% glycerol and
255 2% low-density lipoprotein (G5L2) with addition of different non-enzymatic
256 antioxidants (10 mM).

| Extenders | Parameters | | | | | | |
|-----------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| | TM (%) | PM (%) | VCL ($\mu\text{m/s}$) | VSL ($\mu\text{m/s}$) | VAP ($\mu\text{m/s}$) | LIN (%) | ALH (μm) |
| Control | 36.1 \pm 3.7 ^a | 9.8 \pm 1.6 ^{ab} | 39.7 \pm 1.5 ^a | 16.5 \pm 1.0 ^b | 22.6 \pm 1.1 ^b | 41.0 \pm 1.3 ^{ab} | 2.9 \pm 0.1 ^a |
| G5L2 | 34.9 \pm 4.3 ^a | 11.2 \pm 2.1 ^a | 43.3 \pm 1.9 ^a | 18.8 \pm 1.4 ^{ab} | 25.8 \pm 1.7 ^{ab} | 42.6 \pm 1.6 ^{ab} | 2.8 \pm 0.1 ^a |
| G5L2 + AA | 34.1 \pm 2.9 ^a | 10.1 \pm 1.4 ^{ab} | 42.3 \pm 1.7 ^a | 17.2 \pm 1.2 ^{ab} | 23.3 \pm 1.3 ^{ab} | 39.9 \pm 1.6 ^b | 3.1 \pm 0.1 ^a |
| G5L2 + HB | 35.8 \pm 3.3 ^a | 11.8 \pm 1.7 ^a | 43.8 \pm 2.1 ^a | 20.1 \pm 1.5 ^a | 27.2 \pm 1.8 ^a | 45.3 \pm 2.2 ^a | 2.8 \pm 0.1 ^a |
| G5L2 + AP | 5.7 \pm 0.6 ^b | 0.0 \pm 0.0 ^c | 15.4 \pm 0.7 ^b | 2.9 \pm 0.3 ^c | 5.9 \pm 0.5 ^c | 18.2 \pm 1.9 ^c | 0.2 \pm 0.1 ^b |
| G5L2 + TH | 28.0 \pm 2.5 ^a | 6.9 \pm 1.0 ^{bc} | 38.7 \pm 1.8 ^a | 15.4 \pm 1.3 ^b | 21.7 \pm 1.6 ^b | 38.8 \pm 2.0 ^b | 3.1 \pm 0.1 ^a |

257 AA: ascorbic acid, HB: hydroxytoluene butylate, AP: ascorbyl palmitate, TH: trehalose. TM:
258 total motility; PM: progressive motility; VCL: curvilinear velocity; VSL: progressive velocity;
259 VAP: path velocity; LIN: linearity; ALH: amplitude of lateral head displacement. Within
260 columns, means with no common superscript letters are different ($P < 0.05$).

261 Finally, the structural integrity of sperm membranes was not enhanced by the
262 addition of non-enzymatic antioxidants in the extender G5L2 ($P > 0.05$). Conversely,
263 the functional integrity of ram sperm was lower in the C than most of the extenders
264 tested, except for G5L2+AP ($P < 0.05$; Figure 3).

265 *Experiment III*

266 The extenders G5L8 and G5L8+HB elicited higher total and progressive motility
267 post-thaw, being superior to C in most of the kinematic parameters, except for LIN
268 and ALH ($P < 0,05$). Conversely, the ram sperm cryopreserved in the extender
269 G5L8+AP presented the lowest means for all kinematic endpoints (Table 5).

270 After 3 h of incubation, the total motility of spermatozoa cryopreserved in the
271 extenders containing G5L8 and G5L8+HB was equivalent but superior to extenders
272 C, G5L8+AP, and G5L8+TH ($P < 0.05$). It is noteworthy that extenders C and
273 G5L8+HB did not exhibit a significant reduction in total sperm motility during the
274 incubation period. The addition of AP in the extender with G5L8 reduced the total
275 sperm motility, VCL, and LIN to zero after 2 h of incubation (Table 6).

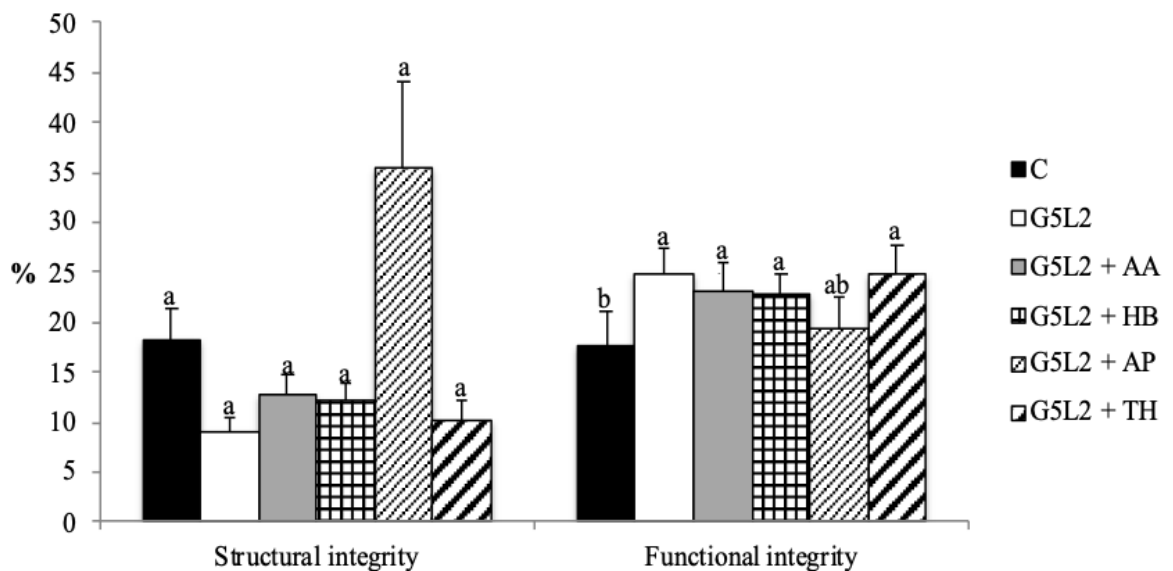
276 In contrast to the other treatments, the structural integrity of sperm membranes
277 was better preserved when the extender containing G5L8+AP was used ($P < 0.05$).
278 On the other hand, there were no differences among treatments on the preservation
279 of sperm membranes functional integrity after the freezing-thawing process (Figure
280 4).

281

282 **Table 4.** Kinematic parameters of ram sperm (mean \pm SEM) frozen in Tris-
 283 glucose base extender containing 16% egg yolk and 5% glycerol (Control) or
 284 using base extender with no egg yolk, 5% glycerol and 2% low-density
 285 lipoprotein (G5L2) with addition of different non-enzymatic antioxidants (10
 286 mM) during 3h of incubation at 38 °C after thawing.

| | | Incubation time | | | |
|------------------|-----------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| | Extender | 0h | 1h | 2h | 3h |
| TM (%) | Control | 36.1 \pm 3.7 ^a | 34.3 \pm 3.8 ^{ab} | 27.2 \pm 3.1 ^a | 20.4 \pm 3.0 ^{ab*} |
| | G5L2 | 34.9 \pm 4.3 ^a | 33.4 \pm 3.3 ^{ab} | 27.1 \pm 3.0 ^a | 25.1 \pm 3.1 ^a |
| | G5L2 + AA | 34.1 \pm 2.9 ^a | 30.4 \pm 2.6 ^{ab} | 23.6 \pm 2.8 ^{a*} | 19.8 \pm 2.3 ^{ab*} |
| | G5L2 + HB | 35.8 \pm 3.3 ^a | 36.5 \pm 3.8 ^a | 25.4 \pm 2.1 ^{a*} | 22.7 \pm 2.5 ^{ab*} |
| | G5L2 + AP | 5.7 \pm 0.6 ^c | 5.2 \pm 0.9 ^c | 0.0 \pm 0.0 ^{c*} | 0.0 \pm 0.0 ^{c*} |
| | G5L2 + TH | 28.0 \pm 2.5 ^{ab} | 26.5 \pm 2.5 ^b | 21.3 \pm 2.1 ^{a*} | 17.1 \pm 1.4 ^{b*} |
| VCL (μ m/s) | Control | 39.7 \pm 1.5 ^a | 39.9 \pm 1.9 ^a | 33.8 \pm 2.3 ^{a*} | 26.7 \pm 2.0 ^{b*} |
| | G5L2 | 43.3 \pm 1.9 ^a | 41.1 \pm 2.2 ^a | 38.0 \pm 2.4 ^{a*} | 32.4 \pm 2.2 ^{a*} |
| | G5L2 + AA | 42.3 \pm 1.7 ^a | 40.4 \pm 2.3 ^a | 33.4 \pm 2.0 ^{a*} | 26.4 \pm 1.7 ^{b*} |
| | G5L2 + HB | 43.8 \pm 2.1 ^a | 44.5 \pm 1.8 ^a | 39.5 \pm 1.8 ^a | 33.2 \pm 2.2 ^{a*} |
| | G5L2 + AP | 15.4 \pm 0.7 ^b | 14.9 \pm 2.0 ^b | 0.0 \pm 0.0 ^{b*} | 0.0 \pm 0.0 ^{c*} |
| | G5L2 + TH | 38.7 \pm 1.8 ^a | 38.4 \pm 2.1 ^a | 34.0 \pm 2.3 ^a | 30.1 \pm 1.6 ^{ab*} |
| LIN (%) | Control | 41.0 \pm 1.3 ^{ab} | 36.9 \pm 1.2 ^a | 35.8 \pm 1.3 ^a | 31.1 \pm 1.7 ^{a*} |
| | G5L2 | 42.6 \pm 1.6 ^{ab} | 34.2 \pm 1.2 ^a | 31.2 \pm 2.0 ^{ab} | 29.1 \pm 2.3 ^{ab*} |
| | G5L2 + AA | 39.9 \pm 1.6 ^b | 34.5 \pm 1.7 ^a | 30.0 \pm 1.5 ^b | 25.5 \pm 2.5 ^{bc*} |
| | G5L2 + HB | 45.3 \pm 2.2 ^a | 35.8 \pm 1.3 ^a | 34.7 \pm 1.6 ^a | 31.2 \pm 2.0 ^{a*} |
| | G5L2 + AP | 18.2 \pm 1.9 ^c | 12.8 \pm 1.7 ^c | 0.0 \pm 0.0 ^c | 0.0 \pm 0.0 ^{d*} |
| | G5L2 + TH | 38.8 \pm 2.0 ^b | 29.3 \pm 1.4 ^b | 27.9 \pm 1.8 ^b | 23.6 \pm 1.9 ^{c*} |

287 Within columns, means with no common superscript letters are different ($P < 0.05$). *
 288 Indicates reduction within treatment during incubation time ($P < 0.05$).



289
290
291
292
293
294
295

Figure 3: Experiment II ram sperm frozen in Tris-glucose base extender containing 16% egg yolk and 5% glycerol (Control, C) or using base extender with no egg yolk, 5% glycerol and 2% low-density lipoprotein (G5L2) with addition of different non-enzymatic antioxidants (10 mM). Structural (IP-CFDA⁺) and functional integrity (hypoosmotic test) post-thaw. AA: ascorbic acid, HB: hydroxytoluene butylate, AP: ascorbyl palmitate, TH: trehalose. Different letters indicate differences among treatments ($P < 0.05$).

296
297
298
299
300

Table 5. Post-thaw kinematic parameters of ram sperm (mean \pm SEM) frozen in Tris-glucose base extender containing 16% egg yolk and 5% glycerol (Control) or using base extender with no egg yolk, 5% glycerol and 8% low-density lipoprotein (G5L8) with addition of different non-enzymatic antioxidants (10 mM).

| Extenders | Parameters | | | | | | |
|-----------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| | TM (%) | PM (%) | VCL ($\mu\text{m/s}$) | VSL ($\mu\text{m/s}$) | VAP ($\mu\text{m/s}$) | LIN (%) | ALH (μm) |
| Control | 31.9 \pm 3.4 ^c | 9.4 \pm 1.9 ^b | 36.6 \pm 2.3 ^b | 16.0 \pm 1.6 ^c | 21.3 \pm 1.8 ^c | 42.3 \pm 2.0 ^b | 2.7 \pm 0.1 ^a |
| G5L8 | 49.5 \pm 3.2 ^a | 18.3 \pm 1.8 ^a | 48.8 \pm 2.0 ^a | 22.6 \pm 1.3 ^{ab} | 30.2 \pm 1.5 ^{ab} | 45.7 \pm 1.3 ^{ab} | 2.8 \pm 0.0 ^a |
| G5L8 + AA | 37.7 \pm 3.4 ^{bc} | 13.4 \pm 1.9 ^{ab} | 47.5 \pm 2.0 ^a | 20.8 \pm 1.4 ^{ab} | 27.7 \pm 1.6 ^b | 43.3 \pm 1.6 ^b | 2.9 \pm 0.1 ^a |
| G5L8 + HB | 46.3 \pm 4.6 ^{ab} | 19.7 \pm 3.3 ^a | 50.5 \pm 2.4 ^a | 25.1 \pm 1.7 ^a | 33.3 \pm 2.1 ^a | 49.0 \pm 1.7 ^a | 2.7 \pm 0.1 ^a |
| G5L8 + AP | 15.2 \pm 0.4 ^d | 0.3 \pm 0.1 ^c | 19.8 \pm 0.8 ^c | 4.7 \pm 0.4 ^d | 9.0 \pm 0.6 ^d | 23.6 \pm 1.3 ^c | 0.5 \pm 0.2 ^b |
| G5L8 + TH | 36.3 \pm 4.5 ^c | 11.5 \pm 1.8 ^b | 43.7 \pm 2.1 ^a | 18.6 \pm 1.5 ^{bc} | 25.4 \pm 1.7 ^{bc} | 41.6 \pm 1.7 ^b | 3.1 \pm 0.1 ^a |

301
302
303
304

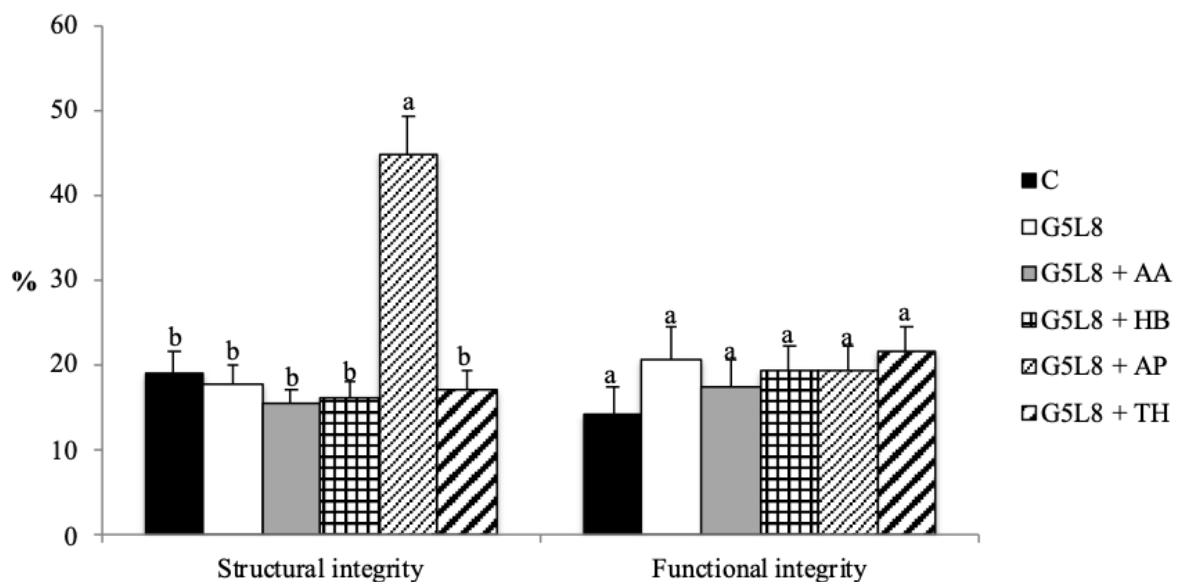
AA: ascorbic acid, HB: hydroxytoluene butylate, AP: ascorbyl palmitate, TH: trehalose. TM: total motility; PM: progressive motility; VCL: curvilinear velocity; VSL: progressive velocity; VAP: path velocity; LIN: linearity; ALH: amplitude of lateral head displacement. Within columns, means with no common superscript letters are different ($P < 0.05$).

305

306 **Table 6.** Kinematic parameters of ram sperm (mean \pm SEM) frozen in Tris-
 307 glucose base extender containing 16% egg yolk and 5% glycerol (Control) or
 308 using base extender with no egg yolk, 5% glycerol and 8% low-density
 309 lipoprotein (G5L8) with addition of different non-enzymatic antioxidants (10
 310 mM) during 3h of incubation at 38 °C after thawing.

| | Extender | Incubation time | | | |
|------------------|-----------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | 0h | 1h | 2h | 3h |
| TM (%) | Control | 31.9 \pm 3.4 ^c | 31.1 \pm 3.6 ^b | 24.9 \pm 3.8 ^c | 22.9 \pm 3.4 ^c |
| | G5L8 | 49.5 \pm 3.2 ^a | 41.3 \pm 3.7 ^{ab} | 39.9 \pm 3.7 ^a | 34.3 \pm 3.7 ^{ab*} |
| | G5L8 + AA | 37.7 \pm 3.4 ^{bc} | 36.1 \pm 2.9 ^{ab} | 30.4 \pm 2.6 ^{bc} | 28.0 \pm 2.3 ^{bc*} |
| | G5L8 + HB | 46.3 \pm 4.6 ^{ab} | 43.5 \pm 5.0 ^a | 38.5 \pm 4.1 ^{ab} | 37.3 \pm 4.3 ^a |
| | G5L8 + AP | 15.2 \pm 0.4 ^d | 9.2 \pm 1.0 ^c | 0.0 \pm 0.0 ^d | 0.0 \pm 0.0 ^{d*} |
| | G5L8 + TH | 36.3 \pm 4.5 ^c | 33.3 \pm 3.7 ^{ab} | 25.6 \pm 2.6 ^c | 20.6 \pm 2.1 ^{c*} |
| VCL (μ m/s) | Control | 36.6 \pm 2.3 ^b | 41.3 \pm 2.5 ^c | 32.3 \pm 2.2 ^d | 28.8 \pm 2.5 ^{b*} |
| | G5L8 | 48.8 \pm 2.0 ^a | 52.9 \pm 2.5 ^{ab} | 50.1 \pm 2.2 ^a | 45.5 \pm 2.5 ^{a*} |
| | G5L8 + AA | 47.5 \pm 2.0 ^a | 47.8 \pm 2.2 ^{ab} | 45.0 \pm 2.1 ^{ab} | 41.0 \pm 2.5 ^{a*} |
| | G5L8 + HB | 50.5 \pm 2.4 ^a | 54.4 \pm 2.6 ^a | 47.6 \pm 2.5 ^a | 47.0 \pm 3.1 ^a |
| | G5L8 + AP | 19.8 \pm 0.8 ^c | 16.6 \pm 0.5 ^d | 0.0 \pm 0.0 ^e | 0.0 \pm 0.0 ^{c*} |
| | G5L8 + TH | 43.7 \pm 2.1 ^a | 45.8 \pm 2.5 ^{bc} | 40.2 \pm 2.8 ^{bc} | 33.0 \pm 2.2 ^{b*} |
| LIN (%) | Control | 42.3 \pm 2.0 ^b | 36.4 \pm 1.3 ^a | 33.2 \pm 1.9 ^{abc} | 31.1 \pm 2.5 ^{b*} |
| | G5L8 | 45.7 \pm 1.3 ^{ab} | 35.2 \pm 1.2 ^{ab} | 36.2 \pm 1.1 ^{ab} | 33.9 \pm 0.9 ^{ab*} |
| | G5L8 + AA | 43.3 \pm 1.6 ^b | 37.4 \pm 1.3 ^a | 34.4 \pm 1.3 ^{abc} | 35.7 \pm 2.1 ^{ab*} |
| | G5L8 + HB | 49.0 \pm 1.7 ^a | 37.8 \pm 1.7 ^a | 37.5 \pm 2.0 ^a | 37.1 \pm 2.3 ^{a*} |
| | G5L8 + AP | 23.6 \pm 1.3 ^d | 20.0 \pm 1.2 ^c | 0.0 \pm 0.0 ^d | 0.0 \pm 0.0 ^{c*} |
| | G5L8 + TH | 41.6 \pm 1.7 ^{bc} | 34.4 \pm 1.3 ^{ab} | 32.4 \pm 1.8 ^{bc} | 31.3 \pm 2.3 ^{b*} |

311 Within columns, means with no common superscript letters are different ($P < 0.05$). *
 312 Indicates reduction within treatment during incubation time ($P < 0.05$).



313 **Figure 4:** Experiment III ram sperm frozen in Tris-glucose base extender containing 16%
 314 egg yolk and 5% glycerol (Control, C) or using base extender with no egg yolk, 5% glycerol
 315 and 8% low-density lipoprotein (G5L8) with addition of different non-enzymatic antioxidants
 316

317 (10 mM). Structural (IP-CFDA⁺) and functional integrity (hypoosmotic test) post-thaw. AA:
318 ascorbic acid, HB: hydroxytoluene butylate, AP: ascorbyl palmitate, TH: trehalose. Different
319 letters indicate statistical differences between treatments ($P < 0.05$).

320 **Discussion**

321 This study was performed to compare the effect of replacing egg yolk with LDL,
322 and the influence of non-enzymatic antioxidants in Tris-Glucose LDL extender on
323 ram sperm quality post-taw. As the same rams were used for all Experiments, the
324 study design with randomized blocks eliminates the ram's influence and the mainly
325 controlled source of variation within Experiment was the different extenders tested.
326 Furthermore, as each Experiment was performed separately (Figure 1), even
327 blocking the rams and establishing minimal fresh semen quality for freezing, we
328 believe that comparisons between Experiments aren't reliable, since different periods
329 of semen collection can affect semen quality and freezability (Martínez-Frenesda et
330 al., 2019; Freitas et al.; 2020; Landaeta-Hernández et al., 2020).

331 The efficacy of both 2 and 8% LDL instead of 16% egg yolk in Tris-Glucose base
332 extender to cryopreserve ram sperm was demonstrated in all the Experiments of the
333 present study, corroborating previous reports [3,11,15,16,18,37]. It was shown that
334 even at a low LDL concentration (2%) it was possible to obtain a high percentage of
335 sperm with functional plasma membrane and post-thaw kinematic parameters similar
336 or superior to Control extender. This probably reflects the effects of LDL as a cellular
337 cryoprotectant [19]. An interaction between LDL and "binder of sperm proteins
338 (BSPs)" of ram seminal plasma was demonstrated, modulating cholesterol efflux and
339 promoting membrane stabilization [9,22]. This interaction remains active after the
340 freezing-thawing process [38] and it was shown that BSPs improved ram sperm
341 quality post-thaw [23], supporting the present results.

342 In Experiment I, incubation significantly reduced total motility only when low LDL
343 and high glycerol (G5L2 and G7L2) or high LDL and low glycerol (G3L8, G3L16, and
344 G5L16) concentrations were associated. The osmolarity itself is not able to explain
345 this reduction since glycerol was mainly responsible for changing the osmolarity of
346 the media. Although Vera-Munoz et al. [16] reported that LDL can prevent effects of
347 glycerol toxicity in bull sperm, the sperm susceptibility to glycerol toxicity differs
348 among species and ram sperm are sensitive to glycerol at concentrations higher than
349 6% [39]. Furthermore, we inferred that the glycerol-LDL interaction in different
350 treatments resulted in variations in sperm membrane stability after freezing-thawing
351 [4] or even influenced the sperm response to osmotic stress, since sperm
352 subpopulation with low osmotic tolerance reduces their viability during
353 cryopreservation [40], culminating with sublethal damage [1] that might be reflected
354 in sperm motility after incubation.

355 *In vitro* manipulations, such as temperature changes, removal of seminal plasma,
356 and the freezing-thawing process are related to higher ROS production or reduction
357 in semen antioxidant activity [2,27]. The effect of non-enzymatic antioxidants on
358 extenders with LDL replacing egg yolk was evaluated in Experiments II and III. We
359 recognize limitations in these Experiments that have to be addressed. If ROS
360 production, total antioxidant capacity, and sperm lipoperoxidation were measured in
361 the different treatments, a better understanding of the influence on non-enzymatic
362 antioxidants tested on sperm oxidative status could be assessed. Therein, to validate
363 our results, we cannot overlook the importance of future studies with a larger number
364 of sperm analysis using different antioxidant concentrations.

365 With regards to the non-enzymatic antioxidants added to extenders in
366 Experiments II and III, it was noticed that HB was able to improve some post-thaw

367 parameters. For Experiment II, it was observed that HB addition resulted in
368 parameters similar to G5L2, but with higher VSL, VAP, and percentage of functional
369 sperm membrane compared with the Control. For Experiment III, HB addition also
370 presented post-thaw sperm parameters similar to G5L8, but it was superior to the
371 Control in several endpoints immediately post-thaw (TM, PM, VSL, VAP, and LIN).
372 Furthermore, unlike what was observed for the G5L8 extender, no significant
373 reduction in total motility and VCL were observed after 3 h of incubation when HB
374 was added. The better stability observed during incubation after adding HB is an
375 important *in vitro* parameter of sperm quality since longer motility maintenance after
376 thawing is related to a higher pregnancy rate after AI [41].

377 Several years ago, the addition of HB to bull semen extender was demonstrated
378 to reduce the membrane damage induced by osmotic stress [42], presenting a
379 synergic protective effect with egg yolk [43]. In sheep, a small protective function
380 related to thermal shock was reported [44], and the benefits of HB for sperm
381 cryopreservation in sheep [45,46] and other species [47-50] was demonstrated.
382 Considering that cryopreservation increases the sperm sensitivity to oxidative stress
383 [2], the effects of HB may go further than thermal shock protection, as HB is a
384 synthetic analogue of vitamin E, an inhibitor of lipoxygenase, and able to prevent
385 oxidation of polyunsaturated fatty acids [25,51].

386 Although TH has an antioxidant function [52] and prevents membrane structural
387 damage during lipid phase transition [53], positive effects from TH addition on both
388 G5L2 and G5L8 extenders were not observed. Improved post-thaw sperm
389 characteristics and fertility was reported after the addition of TH in the extender
390 containing egg yolk [6,54,55]. However, when LDL was used to replace egg yolk, no
391 positive effects of TH during cryopreservation were noticed, and it was observed that

392 it might be harmful to sperm at a high concentration (100 mM) when associated with
393 LDL and glycerol [3,20].

394 No benefit of AA addition was detected, regardless of the LDL concentration
395 tested, which corroborates Sönmez and Demirci [56], who reported no protective
396 effect of AA on thawed ram sperm and toxicity at concentration superior to 20 mM.
397 Conversely, El-Hamid et al. [57] reported positive effects on ram post-thaw sperm
398 quality when AA was added to extender with 40% egg yolk, especially at low
399 concentration (0.1 mM). Azawi and Hussein [58] also obtained better results adding
400 AA (5.0 mM) in extender with 15% egg yolk during maintenance of ram sperm at 5
401 °C. Due to its hydrophilic characteristic, AA presents low efficacy in preventing
402 plasma membrane lipoperoxidation [59]. Considering that LDL presents higher
403 antioxidant potential than egg yolk [16], we inferred that it might obviate identifying
404 any benefit of AA in the present study, but no toxic effect was detected in the
405 concentration used (10 mM).

406 The AP demonstrated high sperm toxicity at 10 mM. Ascorbyl palmitate is a
407 lipophilic derivate of AA [60] and for decades has been used as a food additive due
408 to its antioxidant properties [61]. After oral administration of AP, the molecule is
409 esterified in ascorbic and palmitic acids, but the in vitro addition of AP inhibited
410 cytochrome P450 activity [62]. In general, proteins from the cytochrome P450
411 superfamily participate in biosynthesis and signalization of several cellular pathways
412 [63]. The lower expression or modification in enzymatic pathways of cytochrome
413 P450 was related to low semen quality in humans [64,65], which might explain the
414 negative effect on sperm motility after adding AP to the extender. Unfortunately, no
415 studies with the addition of AP on media for sperm cryopreservation were found in
416 the literature and, with data from the present study, we are not able to explain the

417 higher percentage of thawed sperm with both plasma and acrosomal membrane
418 integrity, but no effect on membrane functionality and impairment of sperm motility.

419 **Conclusion**

420 Low-density lipoprotein at 2 and 8% is effective for replacing egg yolk in Tris-
421 Glucose extender for ram sperm cryopreservation. Moreover, the addition of 10 mM
422 HB in Tris-Glucose extender with 8% LDL improves velocity parameters immediately
423 post-thaw compared with Tris-Glucose egg yolk extender, as well as prevents the
424 reduction of total motility and VCL during 3 h of incubation at 38 °C. However, further
425 studies with a dose-response analysis of HB are important to comprehend the
426 influence of this antioxidant during ram sperm cryopreservation. For the first time, it is
427 shown that ascorbyl palmitate is a toxic antioxidant to ram sperm when added to
428 extender at 10 mM.

429 **Author Contributions:** Conceptualization:P.P.N.S., M.H, and M.M.N.; formal
430 analysis P.P.N.S., L.C.O.M., M.C.S., and M.R.T.N, writing – original draft preparation,
431 D.R.C, P.P.N.S; writing-review and editing, P.P.N.S., M.H, M.M.N. and D.R.C. All
432 authors agreed to the published version of the manuscript.

433 **Funding:** FAPESB, FAPEMIG and CNPq.

434 **Acknowledgments:** We thank Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine for providing the
435 antioxidants used in this experiment.

436 **Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no
437 role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in
438 the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

439 **References**

- 440 1. Peña, F.J.; Johannisson, A.; Wallgren, M.; Rodriguez-Martinez, H. Antioxidant
441 supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial
442 membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate.
443 *Anim. Reprod. Sci.*, **2003**, *78*, 85–98. [https://doi.org/10.1016/s0378-](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(03)00049-6)
444 [4320\(03\)00049-6](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(03)00049-6)
- 445 2. Marti, E.; Marti, J.I.; Muiño-Blanco, T.; Cebrián-Pérez, J.A. Effect of
446 cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidants
447 enzymes in ram spermatozoa. *J. Androl.*, **2008**, *29*, 459–467.
448 <https://doi.org/10.2164/jandrol.107.003459>
- 449 3. Tonieto, R.A.; Goularte, K.L.; Gastal, G.D.A.; Schiavon, R.S.; Deschamps, J.C.;
450 Lucia Jr, T. Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in
451 extenders for frozen ram semen. *Small Rum. Res.*, **2010**, *93*, 206–209.
452 <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.05.003>
- 453 4. Pini, T.; Leahy, T.; de Graaf, S.P. Sublethal sperm freezing damage:
454 manifestations and solutions. *Theriogenology*, **2018**, *188*, 172–181.
455 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.06.006>
- 456 5. Peris-Frau, P.; Soler, A.J.; Iniesta-Cuerda, M.; Martín-Maestro, A.; Sánchez-
457 Ajofrín, I.; Medina-Chávez, D.A.; Fernández-Santos, M.R.; García-Álvarez, O.;
458 Maroto-Morales, A.; Montoro, V.; Garde, J.J. Sperm cryodamage in ruminants:
459 understanding the molecular changes induced by the cryopreservation process to
460 optimize sperm quality. *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, *21*, 2781, 2020.
461 <https://doi.org/10.3390/ijms21082781>
- 462 6. Öztürk, A.E.; Bodu, M.; Bucak, M.N.; Agir, V.; Özcan, A.; Keskin, N.; Ili, P.;
463 Topraggaleh, T.R.; Sidal, H.; Baspinar, N.; Dursun, S. The synergistic effect of
464 trehalose and low concentration of cryoprotectants can improve post-thaw ram

- 465 sperm parameters. *Cryobiology*, **2020**, *95*, 157–163.
466 <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.03.008>
- 467 7. Ball, B.A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm
468 function and preservation in the horse. *Anim. Reprod. Sci.*, **2008**, *107*, 257–267.
469 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.014>
- 470 8. Morris, G.J.; Faszler, K.; Green, J.E.; Draper, D.; Grout, B.W.W.; Fonseca, F.
471 Rapidly cooled horse spermatozoa: loss of viability is due to osmotic imbalance
472 during thawing, not intracellular ice formation. *Theriogenology*, **2007**, *68*, 804–
473 812. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.06.009>
- 474 9. Sieme, H.; Oldenhof, H.; Wolkers, W.F. Sperm membrane behaviour during
475 cooling and cryopreservation. *Reprod. Dom. Anim.*, **2015**, *50* (Suppl. 3), 20-26.
476 <https://doi.org/10.1111/rda.12594>
- 477 10. Hezavehei, M.; Sharafi, M.; Kouchesfahani, H.M.; Henkel, R.; Agarwal, A.;
478 Esmaeili, V.; Shahverdi, A. Sperm cryopreservation: a review on current
479 molecular cryobiology and advanced approaches. *Reprod. Biomed. Online*, **2018**,
480 *37*, 327–339. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012>
- 481 11. Silva, M.C.; Moura, L.C.O.; Melo, M.I.V.; Mambrini, J.V.M.; Neves, M.M.; Henry,
482 M.R.J.M.; Snoeck, P.P.N. Prolonged post cooling but not pre-cooling equilibrium
483 length improves the viability of ram sperm cryopreserved in an extender
484 containing low-density lipoproteins. *Small Rum. Res.*, **2014**, *119*, 88–95.
485 <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.02.006>
- 486 12. Alçay, S.; Toker, M.B.; Gokce, E.; Ustuner, B.; Onder, N.T.; Sagirkaya, H.; Nur,
487 Z.; Soyulu, M.K. Successful ram semen cryopreservation with lyophilized egg yolk-
488 based extender. *Cryobiology*, **2015**, *71*, 329–333.
489 <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.08.008>

- 490 13. Hu, J.H.; Li, Q.W.; Zan, L.S.; Jiang, Z.L.; An, J.H.; Wang, L.Q.; Jia, Y.H. The
491 cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa
492 following freezing-thawing. *Anim. Reprod. Sci.*, **2010**, *117*, 11–17.
493 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.04.001>
- 494 14. Hu, J.H.; Jiang, Z.L.; Lv, R.K.; Li, Q.W.; Zhang, S.S.; Zan, L.S.; Li, Y.K.; Li, X.
495 The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen.
496 *Cryobiology*, **2011**, *62*, 83–87. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.12.007>
- 497 15. Moustacas, V.S.; Zaffalon, F.G.; Lagares, M.A.; Loaiza-Eccheverri, A.M.; Varago,
498 F.C.; Neves, M.M.; Heneine, L.G.D.; Arruda, R.P.; Henry, M. Natural, but not
499 lyophilized, low density lipoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for
500 cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, **2011**, *75*, 300–307.
501 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.08.016>
- 502 16. Vera-Munoz, O.; Amirat-Briand, L.; Bencharif, D.; Anton, M.; Descherces, S.;
503 Shmitt, E.; Thorin, C.; Tainturier, D. Effect of low-density lipoproteins,
504 spermatozoa concentration and glycerol on functional and motility parameters of
505 bull spermatozoa during storage at 4 °C.; *Asian, J. Androl.*, **2011**, *13*, 281–286.
506 <https://doi.org/10.1038/aja.2010.84>
- 507 17. Neves, M.M.; Heneine, L.G.D.; Henry, M. Cryoprotection effectiveness of low
508 concentration of natural lyophilized LDL (low density lipoproteins) on canine
509 spermatozoa. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, **2014**, *66*, 769–777.
510 <https://doi.org/10.1590/1678-41626184>
- 511 18. Perumal, P.; Srivastava, S.K.; Ghosh, S.K.; Baruah, K.K.; Bag, S.; Rajoria, J.S.;
512 Kumar, K.; Rajkhowa, C.; Pande, M.; Srivastava, N. Effects of low-density
513 lipoproteins as additive on quality parameters and oxidative stress following

- 514 cryopreservation of mithun (*Bos frontalis*) spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.*,
515 **2016**, *51*, 708–716. <https://doi.org/10.1111/rda.12735>
- 516 19. Belala, R.; Briand-Amirat, L.; Martinot, A.; Thorin, C.; Michaud, S.; Desherces, S.;
517 Youngs, C.R.; Bencharif, D. A comparison of liquid and lyophilized egg yolk
518 plasma to low density lipoproteins for freezing of canine spermatozoa. *Reprod.*
519 *Domest. Anim.*, **2019**, *54*, 1131–1138. <https://doi.org/10.1111/rda.13476>
- 520 20. Varela, E.; Rojas, M.; Restrepo, G. Membrane stability and mitochondrial activity
521 of bovine sperm frozen with low-density lipoproteins and trehalose. *Reprod. Dom.*
522 *Anim.*, **2020**, *55*, 146–153. <https://doi.org/10.1111/rda.13599>
- 523 21. Brouwers, F.H.M.; Gadella, B.M. In situ detection and localization of lipid
524 peroxidation in individual bovine sperm cell. *Free Radic. Biol. Med.*, **2003**, *35*,
525 1382–1391. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.08.010>
- 526 22. Bergeron, A.; Villemure, M.; Lazure, C.; Manjunath, P. Isolation and
527 characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Mol. Reprod. Dev.*,
528 **2005**, *71*, 461–470. <https://doi.org/10.1002/mrd.20310>
- 529 23. Pini, T.; Farmer, K.; Druart, X.; Teixeira-Gomes, A.P.; Tsikis, G.; Labas, V.;
530 Leahy, T.; de Graaf, S.P. Binder of sperm proteins protect ram spermatozoa from
531 freeze-thaw damage. *Cryobiology*, **2018**, *82*, 78–87.
532 <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.04.005>
- 533 24. Tremellen, K. Oxidative stress and male infertility – a clinical perspective. *Hum.*
534 *Reprod. Update*, **2008**, *14*, 243–258. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn004>
- 535 25. Bast, A.; Haenen, G.R.M.M.; Doelman, C.J.A. Oxidants and antioxidants: state of
536 the art. *Am. J. Med.*, **1991**, *91*(Supp 3), S2-S13. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(91\)90278-6](https://doi.org/10.1016/0002-9343(91)90278-6)
537

- 538 26. Allai, L.; Benmoula, A.; Maia, M.S.; Nasser, B.; Amiri, B.E. Supplementation of
539 ram semen extender to improve quality and fertility rate. *Anim. Reprod. Sci.*,
540 **2018**, *192*, 6–17. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.019>
- 541 27. Baldi, E.; Tamburrino, L.; Muratori, M.; Degl'Innocenti, S.; Marchiani, S. Adverse
542 effects of in vitro manipulation of spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, **2020**, *220*,
543 106314. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106314>
- 544 28. Gibb, Z.; Griffin, R.A.; Aitken, R.J.; Iulius, G.N. Functions and effects of reactive
545 oxygen species in male infertility. *Anim. Reprod. Sci.*, **2020**, *220*, 106456.
546 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106456>
- 547 29. Cirit, Ü.; Bagis, H.; Demir, K.; Agca, C.; Pabuccuoglu, S.; Varisli, Ö.; Clifford-
548 Rathert, C.; Agca, Y. Comparison of cryoprotective effects of iodixanol, trehalose,
549 and cysteamine on ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, **2013**, *139*, 38–44.
550 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.03.010>
- 551 30. Snoeck, P.P.N.; Moura, L.C.O.; Clemente, C.A.A.; Loaiza-Echeverri, A.M.;
552 Neves, M.M.; Allaman, I.B.; Henry, M. Effects of catalase, superoxide dismutase
553 and reduced glutathione in LDL extender on ovine cryopreserved sperm viability.
554 *Semin-Ciênc. Agrár.*, **2015**, *36*, 2593–2602. [http://dx.doi.org/10.5433/1679-](http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n4p2593)
555 [0359.2015v36n4p2593](http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n4p2593)
- 556 31. Amidi, F.; Pazhohan, A.; Shabani, N.M.; Khodarahmian, M.; Nekoonam, S. The
557 role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell Tissue Bank.*, **2016**, *17*,
558 745–756. <https://doi.org/10.1007/s10561-016-9566-5>
- 559 32. Fang, Y.; Zhong, R. Effect of oxidative stress on spermatozoa and male fertility.
560 In *Free Radical Medicine and Biology*, 1st ed.; Das, K. IntechOpen. 22p. 2019.
561 [10.5772/intechopen.86585](https://doi.org/10.5772/intechopen.86585)

- 562 33. Galarza, D.A.; López-Sebastián, A.; Santiago-Moreno, J. Supplementing a
563 skimmed milk-egg yolk-based extender with L-carnitine helps maintain the motility,
564 membrane integrity and fertilizing capacity of chilled ram sperm. *Reprod.*
565 *Domest. Anim.*, **2020**, *55*, 805–813. <https://doi.org/10.1111/rda.13687>
- 566 34. Balaro, M.F.A.; Fonseca, J.F.; Oba, E.; Cardoso, E.C.; Brandão, F.Z. Is the Santa
567 Inês sheep a typical non-seasonal breeder in the Brazilian Southeast? *Trop.*
568 *Anim. Health Prod.*, **2014**, *46*, 1533-1537. [https://doi.org/10.1007/s11250-014-](https://doi.org/10.1007/s11250-014-0672-8)
569 [0672-8](https://doi.org/10.1007/s11250-014-0672-8)
- 570 35. Melo, M.I.V.; Henry, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen eqüino. *Arq.*
571 *Bras. Med. Vet. Zootec.*, **1999**, *51*, 71–78.
572 <https://www.scielo.br/pdf/abmvz/v57n6/28759.pdf>
- 573 36. Harrison, R.A.P.; Vickers, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane
574 integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, **1990**, *88*, 343–352.
575 <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0880343>
- 576 37. Loaiza-Echeverri, A.M.; Cruz, B.C.; Snoeck, P.P.N.; Moura, L.C.O.; Nevez, B.P.;
577 Nevez, M.M.; Heneine, L.G.D.; Henry, M. Low density lipoproteins added to an
578 extender frozen or lyophilized are evenly efficient in cryoprotecting ovine sperm
579 cells than when 16% egg yolk was added. *Semin-Ciênc. Agrár.*, **2015**, *36*, 1335–
580 1346. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n3p1315>
- 581 38. Bergeron, A.; Manjunath, P. New insights towards understanding the mechanism
582 of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol. Reprod. Dev.*, **2006**, *73*, 1338–
583 1344. <https://doi.org/10.1002/mrd.20565>
- 584 39. Fiser, P.S.; Fairfull, R.W. The effect of glycerol concentration and cooling velocity
585 on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. *Cryobiology*, **1984**, *21*,
586 542–551. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(84\)90053-1](https://doi.org/10.1016/0011-2240(84)90053-1)

- 587 40. Ugur, M.R.; Abdelrahman, A.S.; Evans, H.C.; Gilmore, A.A.; Hitit, M.; Arifiantini,
588 R.I.; Purwantara, B.; Kaya, A.; Memili, E. Advances in cryopreservation of bull
589 sperm. *Front. Vet. Sci.*, **2019**, *6*:268, 2019.
590 <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffvets.2019.00268>
- 591 41. Bag, S.; Joshi, A.; Naqvi, S.M.K.; Mittal, J.P. Effect of post-thaw incubation on
592 sperm kinematics and acrosomal integrity of ram spermatozoa cryopreserved in
593 medium-sized French straws. *Theriogenology*, **2004**, *62*, 415–424.
594 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.10.018>
- 595 42. Hammerstedt, R.H.; Amann, R.P.; Rucinsky, T.; Morse II, P.D.; Lepock, J.;
596 Snipes, W.; Keith, A.D. Use of spin and electron spin resonance spectroscopy to
597 characterize membranes of bovine sperm: effect of butylated hydroxytoluene and
598 cold shock. *Biol. Reprod.*, **1976**, *14*, 381–397.
599 <https://doi.org/10.1095/biolreprod14.4.381>
- 600 43. Graham, J.K.; Hammerstedt, R.H. Differential effects of butylated hydroxytoluene
601 analogs on bull sperm subjected to cold-induced membrane stress. *Cryobiology*,
602 **1992**, *29*, 106–117. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(92\)90010-Y](https://doi.org/10.1016/0011-2240(92)90010-Y)
- 603 44. Watson, P.F.; Anderson, W.J. Influence of butylated hydroxytoluene (BHT) on the
604 viability of ram spermatozoa undergoing cold shock. *Reproduction*, **1983**, *69*,
605 229–235. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0690229>
- 606 45. Farshad, A.; Khalili, B.; Jafaroghli, M. Effects of butylated hydroxytoluene on
607 freezability of ram spermatozoa. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.*, **2010**, *23*, 1276–
608 1281. <https://doi.org/10.5713/ajas.2010.90590>
- 609 46. Palomo, M.J.; Garcia, W.; Tabarez, A. Effect of seminal plasma and butylated
610 hydroxytoluene (BHT) concentration on ram sperm freezability. *Small Rum. Res.*,
611 **2017**, *153*, 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.05.010>

- 612 47. Memon, A.A.; Wahid, H.; Rosnina, Y.; Goh, Y.M.; Ebrahimi, M.; Nadia, F.M.;
613 Audrey, G. Effect of butylated hydroxytoluene on cryopreservation of Boer goat
614 semen in Tris egg yolk extender. *Anim. Reprod. Sci.*, **2011**, *129*, 44–49.
615 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.10.004>
- 616 48. Naijian, H.R.; Kohram, H.; Shahneh, A.Z.; Sharafi, M.; Bucak, M.N. Effects of
617 different concentrations of BHT on microscopic and oxidative parameters of
618 Mahabadi goat semen following the freeze-thaw process. *Cryobiology*, **2013**, *66*,
619 151–155. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.12.010>
- 620 49. Neagu, V.R.; García, B.M.; Sandoval, C.S.; Rodríguez, A.M.; Ferrusola, C.O.;
621 Fernández, L.G.; Tapia, J.A.; Peña, F.J. Freezing dog semen in presence of the
622 antioxidant butylated hydroxytoluene improves post-thaw sperm membrane
623 integrity. *Theriogenology*, **2010**, *73*, 645–650.
624 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.10.021>
- 625 50. Merino, O.; Aguagüiña, W.E.; Esponda, P.; Risopatrón, J.; Isachenko, E.;
626 Isachenko, V.; Sánchez, R. Protective effect of butylated hydroxytoluene on
627 sperm function on human spermatozoa cryopreserved by vitrification technique.
628 *Andrologia*, **2015**, *47*, 186–193. <https://doi.org/10.1111/and.12246>
- 629 51. Hanada, H. Disruption of vitamin E and butylated hydroxytoluene antioxidant
630 function in response to paraquat-induced chromosomal damage in cultures
631 Anuran leukocytes. *Biol. Med.*, **2015**, *7*, 222. [https://doi.org/10.4172/0974-
632 8369.1000222](https://doi.org/10.4172/0974-8369.1000222)
- 633 52. Oku, K.; Watanabe, H.; Kubota, M.; Fukuda, S.; Kurrimoto, M.; Tsujisaka, Y.;
634 Komori, M.; Inoue, Y.; Sakurai, M. NMR and quantum study of the OH[•]π and
635 CH[•]O interactions between trehalose and unsaturated fatty acids: implication for

- 636 the mechanism of antioxidant function of trehalose. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**,
637 125, 12739–12748. <https://doi.org/10.1021/ja034777e>
- 638 53. Najafi, A.; Zhandi, M.; Towhidi, A.; Sharafi, M.; Sharaf, A.A.; Motlagh, M.K.;
639 Martinez-Pastor, F. Trehalose and glycerol have a dose-dependent synergistic
640 effect on the post-thaw quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-
641 based extender. *Cryobiology*, **2013**, 66, 275–282.
642 <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.03.002>
- 643 54. Rostami, B.; Ebrahimi, D.; Sadeghipanah, H.; Masoumi, R.; Shahir, M.H. Effects
644 of supplementation of tris-egg yolk extender with different sugars and
645 antioxidants on freezability of ram semen. *Cryobiology*, **2020**, 92, 62–66.
646 <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.10.198>
- 647 55. Aisen, E.G.; Medina, V.H.; Venturino, A. Cryopreservation and post-thawed
648 fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations.
649 *Theriogenology*, **2002**, 57, 1801–1808, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0093-](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00653-2)
650 [691X\(02\)00653-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00653-2)
- 651 56. Sönmez, M.; Demirci, E. The effect of ascorbic acid on the freezability of ram
652 semen diluted with extenders containing different proportions of glycerol. *Turk. J.*
653 *Vet. Anim. Sci.*, **2004**, 28, 893–899.
- 654 57. El-Hamid, I.S.A.; Khalifa, M.A.; Shedeed, H.A.; Rateb, S.A. Cryosurvival of ram
655 spermatozoa after supplementing the diluent with L-ascorbic acid or α -
656 tocopherol. *Int. J. Vet. Sci.*, **2018**, 7, 197–204. [http://www.ijvets.com/pdf-](http://www.ijvets.com/pdf-files/Volume-7-no-4-2018/197-204.pdf)
657 [files/Volume-7-no-4-2018/197-204.pdf](http://www.ijvets.com/pdf-files/Volume-7-no-4-2018/197-204.pdf)
- 658 58. Azawi, O.I.; Hussein, E.K. Effects of vitamins C and E supplementation to Tris
659 diluent on the semen quality of Awassi rams preserved at 5 °C. *Vet. Res. Forum*,
660 **2013**, 4, 157–160.

- 661 59. Agarwal, A.; Tadros, H.; Panicker, A.; Tvrdá, E. Role of oxidants and antioxidants
662 in male reproduction. In *Oxidative stress and antioxidant protection: the science*
663 *of free radical biology and disease*. 1st ed.; Armstrong, D., Stratton, R. D. Jonh
664 Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, New Jersey, USA, **2016**; pp. 221-252.
665 <https://doi.org/10.1002/9781118832431.ch15>
- 666 60. Caritá, A.C.; Fonseca-Santos, B.; Shultz, J.D.; Michniak-Kohn, B.; Chorilli, M.;
667 Leonardi, G.R. Vitamin C: one compound, several uses. Advances for delivery,
668 efficiency and stability. *Nanomed-Nanotechnol.*, **2020**, *24*, 102117, 2020.
669 <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102117>
- 670 61. JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), 1974.
671 Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents,
672 antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents. WHO Food
673 Additives Series n. 5. Seventeenth Meeting of the Joint FAO/WHO Expert
674 Committee on Food Additives, Geneva.
675 <https://doi.org/10.1002/food.19760200616>
- 676 62. Dresser, G.K.; Wacher, V.; Wong, S.; Wong, H.T.; Bailey, D.G. Evaluation of
677 peppermint oil and ascorbyl palmitate as inhibitors of cytochrome P4503A4
678 activity in vitro and in vivo. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **2002**, *72*, 247–255.
679 <https://doi.org/10.1067/mcp.2002.126409>
- 680 63. Denisov, I.G.; Makris, T.M.; Sligar, S.G.; Schlichting, I. Structure and chemistry of
681 cytochrome P450. *Chem. Rev.*, **2005**, *105*, 2253–2278.
682 <https://doi.org/10.1021/cr0307143>
- 683 64. Said, L.; Saad, A.; Carreau, S. Differential expression of mRNA aromatase in
684 ejaculated spermatozoa from infertile men in relation to either

- 685 asthenozoospermia or teratozoospermia. *Andrologia*, **2014**, *46*, 136–146.
686 <https://doi.org/10.1111/and.12058>
- 687 65. Yu, L.; Yang, X.; Ma, B.; Ying, H.; Shang, X.; He, B.; Zhang, Q. Abnormal
688 arachidonic acid metabolic network may reduce sperm motility via P38 MAPK.
689 *Open Biol.*, **2019**,*9*: 180091. <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.1800>

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso objetivo foi avaliar o efeito da associação entre diferentes concentrações de LDL (2, 8 e 16%) e glicerol (3, 5 e 7%) em diluidor Tris-glicose, a fim de saber qual a melhor para preservar a motilidade, parâmetros cinemáticos e integridade funcional e estrutural das membranas espermáticas durante a criopreservação, além de avaliar qual o melhor antioxidante não enzimático entre Ácido Ascórbico, Butilato de Hidroxitolueno, Palmitato de Ascorbila e Trealose para maximizar o potencial do diluidor contendo LDL durante o processo de criopreservação. Os resultados obtidos demonstraram que a lipoproteína de baixa densidade foi eficaz ao substituir a gema de ovo em diluidores a base Tris-Glicose para criopreservação de espermatozoides na espécie ovina, possibilitando melhorias na qualidade do espermatozoide pós-descongelamento. Além disso, foi possível constatar que a adição de alguns antioxidantes não enzimáticos ao diluidor contendo LDL melhorou parâmetros cinemáticos imediatamente após a descongelamento. Enquanto o palmitado de ascorbila interfere negativamente com os parâmetros cinemáticos apesar de ter uma influência positiva na integridade estrutural dos espermatozoides.

O experimento I foi importante para estabelecer qual a combinação ideal entre LDL e glicerol para ser utilizada em diluidores de sêmen ovino. As duas melhores combinações foram utilizadas nos experimentos II e III que testou ainda a incorporação de diferentes antioxidantes. O trabalho gerou minha dissertação acadêmica e vai gerar um artigo que será publicado em revista especializada a fim de garantir que os resultados obtidos possam impactar na maximização do potencial reprodutivo de machos ovinos de alto padrão zootécnico, influenciar a cadeia produtiva da carne e os resultados serem transferidos para outros veterinários que trabalham para melhorar a qualidade dos espermatozoides ovino criopreservados.

Esperamos contribuir com o conhecimento sobre a criopreservação de sêmen ovino, uma espécie que os espermatozoides apresentam uma sensibilidade maior quando comparada aos caprinos.

AGRADECIMENTO

Ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro e ao setor de Reprodução Animal da Escola de Veterinária da UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais) pelo suporte técnico.

REFERÊNCIAS

ABDELHAKEM, A. A.; GRAHAM, E. F.; VAZQUEZ, I. A. Studies on the Presence and Absence of Glycerol in Unfrozen and Frozen Ram Semen: Fertility Trials and the Effect of Dilution Methods on Freezing Ram Semen in the Absence of Glycerol, **Cryobiology**, v. 28, p. 36-42, 1991.

ALCAY, S.; TOKER, M.B.; GOKCE, E.; USTUNER, B.; ONDER, N.T.; SAGIRKAYA, H.; NUR, Z.; SOYLU, M.K. Successful ram semen cryopreservation with lyophilized egg yolk-based extender. **Cryobiology**, v. 71, p. 329–333, 2015.

AGARWAL, A.; MAKKER, K.; SHARMA, R. Clinical Relevance of Oxidative Stress in Male Factor Infertility: An Update. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 59, p. 2-11, 2007.

AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S. A.; SAID, T. M. Prevention of Oxidative Stress Injury to Sperm. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 6, 654-660, 2005.

AGARWAL, A.; TADROS, H.; PANICKER, A.; TVRDÁ, E. Role of oxidants and antioxidants in male reproduction. In **Oxidative stress and antioxidant protection: the science of free radical biology and disease**. 1st ed.; Armstrong, D., Stratton, R. D. John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, New Jersey, USA, p. 221-252, 2016.

AISEN, E.G.; MEDINA, V.H.; VENTURINO, A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. **Theriogenology**, v. 57, p. 1801–1808, 2002.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S.; FISHEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 183-197, 1989.

AITKEN, R. J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 257-265, 1993.

AJAY, C.; SATYENDRA, P.; PIYALI, D.; RAMJI, S. Influence of Oxidative Stress on Functional Integrity of Human Spermatozoal Membrane. **The Journal of Obstetrics and Gynecology of India**, v. 61, n. 2, p. 195-199, 2011.

ALI AL AHMAD, M. Z.; CHATAGNON, G.; AMIRAT-BRIAND, L.; MOUSSA, M.; TAINURIER, D.; ANTON, M.; FIENI, F. Use of Glutamine and Low Density Lipoproteins Isolated from Egg Yolk to Improve Buck Semen Freezing. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 429–436, 2008.

ALLAI, L.; BENMOULA, A.; MAIA, M.S.; NASSER, B.; AMIRI, B.E. Supplementation of ram semen extender to improve quality and fertility rate. **Animal Reproduction Science**, 2018, v. 192, p. 6–17, 2018.

AMIDI, F.; PAZHOHAN, A.; SHABANI, N.M.; KHODARAHMIAN, M.; NEKOONAM, S. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. **Cell Tissue Bank.**, v. 17, p. 745–756, 2016

AX, R. L.; DALLY, M.; DIDION, B. A.; LENZ, R. W.; LOVE, C. C.; VARNER, D. D.; HAFEZ, B.; BELLIN, M. E. Avaliação do sêmen. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7. Ed. São Paulo: Manole, 2004a.

AX, R. L.; DALLY, M.; DIDION, B. A.; LENZ, R. W.; LOVE, C. C.; VARNER, D. D.; HAFEZ, B.; BELLIN, M. E. Inseminação artificial. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7. Ed. São Paulo: Manole, 2004b.

AZAWI, O.I.; HUSSEIN, E.K. Effects of vitamins C and E supplementation to Tris diluent on the semen quality of Awassi rams preserved at 5 °C. **Veterinary ReseachForum**, v. 4, p. 157–160, 2013.

AZEVEDO, H. C.; MAIA, M. S.; BICUDO, S. D.; SOUSA, D. B.; RODELLO, L.; SICHERLE, C. C. Cinética e integridade dos espermatozoides no sêmen ovino submetido a diferentes ritmos de refrigeração e congelação em sistema automatizado. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16º, 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia: CBRA, 2005

BAG, S.; JOSHI, A.; NAQVI, S.M.K.; MITTAL, J.P. Effect of post-thaw incubation on sperm kinematics and acrosomal integrity of ram spermatozoa cryopreserved in medium-sized French straws. **Theriogenology**, v. 62, p. 415–424, 2004.

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

BAILEY, J. L.; LESSARD, C.; JACQUES, J.; BRÈQUE, C.; DOBRINSKI, I.; ZENG, W.; GALANTINO-HOMER, H. L. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. **Theriogenology**, v. 70, p. 1251-1259, 2008.

BALDI, E.; TAMBURRINO, L.; MURATORI, M.; DEGL'INNOCENTI, S.; MARCHIANI, S. Adverse effects of in vitro manipulation of spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 220, 106314, 2020.

BALL, A. B. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 257–267, 2008.

BANSAL, A. K.; BILASPURI, G. S. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. **Veterinary Medicine International**, vol. 2011, Article ID 686137, 7 páginas, 2011. doi:10.4061/2011/686137.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames IA: Iowa state University, 285p, 1989

BAST, A.; HAENEN, G.R.M.M.; DOELMAN, C.J.A. Oxidants and antioxidants: state of the art. **American Journal of Medicine**, v. 91(Supp 3), p. 2-13, 1991.

BEDFORD, J.B. Why do penetrating sperm create an oblique path in the zona pellucida? **Reproduction**, v.131, p.23-25, 2006.

BELALA, R.; BRIAND-AMIRAT, L.; MARTINOT, A.; THORIN, C.; MICHAUD, S.; DESHERCES, S.; YOUNGS, C.R.; BENCHARIF, D. A comparison of liquid and lyophilized egg yolk plasma to low density lipoproteins for freezing of canine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, p. 1131–1138, 2019.

BERGERON, A.; CRÊTE, M.H.; BRINDLE, Y. ET AL. Low-Density Lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 708-717, 2004.

BERGERON, A.; VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. **Molecular Reproduction and development**, v. 71, p. 461–470, 2005.

BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanism of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular Reproduction and development**, v. 73, p. 1338–1344, 2006.

BILODEAU, J. F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M. A.; GAGNON, C. Levels of Antioxidant Defenses Are Decreased in Bovine Spermatozoa After a Cycle of Freezing and Thawing. **Molecular Reproduction and development**, v. 55, p. 282-288, 200.

BORG, C. L.; WOLSKI, K. M.; GIBBS, G. M.; O'BRYAN, M. K. Phenotyping male infertility in the mouse: how to get the most out of a 'non-performer'. **Human Reproduction Update**, v. 16, n. 2, p. 205-224, 2010.

BROUWERS, F.H.M.; GADELLA, B.M. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cell. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, p. 1382–1391, 2003.

BUENO, R. **Criopreservação de sêmen canino, utilizando dois diluidores e dois protocolos de resfriamento**. 2000. 106p. Tese ("Magister Scientiae"). Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária. Universidade de Viçosa, 2000.

BUSTAMANTE FILHO, I. C.; PEDERZOLLI, C. D.; SGARAVATTI, A. M.; GREGORY, R. M.; DUTRA FILHO, C. S.; JOBIM, M. I. M.; MATTOS, R. C. Skim milk-egg yolk based semen extender compensates for non-enzymatic antioxidant activity loss during equine semen cryopreservation. **Animal Reproduction**, v. 6, n. 2, p. 392-399, 2009.

CARITÁ, A.C.; FONSECA-SANTOS, B.; SHULTZ, J.D.; MICHNIAK-KOHN, B.; CHORILLI, M.; LEONARDI, G.R. Vitamin C: one compound, several uses. Advances for delivery, efficiency and stability. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 24:102117, p. 1-15 2020.

CIRIT, Ü.; BAGIS, H.; DEMIR, K.; AGCA, C.; PABUCCUOGLU, S.; VARISLI, Ö.; CLIFFORD-RATHERT, C.; AGCA, Y. Comparison of cryoprotective effects of iodixanol, trehalose, and cysteamine on ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 139, p. 38–44, 2013.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**, p. 31-34, 1998.

COLAS, G. Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 42, p. 277-285, 1975.

CURRY, M. R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. **Reviews of Reproduction**, v. 5, p. 46–52, 2000.

DAUPHAS, S.; BEAUMAL, V.; RIAUBLANC, A.; ANTON M. Hen egg yolk low-density lipoproteins film spreading at the air-water and oil-water interfaces. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 10, p. 3733-3737, 2006.

DENISOV, I.G.; MAKRIS, T.M.; SLIGAR, S.G.; SCHLICHTING, I. Structure and chemistry of cytochrome P450. **Chemical Reviews**, v. 105, p. 2253–2278, 2005.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 14, p. 255-265, 1993.

DOMÍNGUEZ, M. P.; FALCINELLI, A.; HOZBOR, F.; SÁNCHEZ, E.; CESARI, A.; ALBERIO, R. H. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. **Theriogenology**, v. 69, p. 564–573, 2008.

DONG, Q. X.; RODENBURG, S.; HILL, D.; VANDERVOORT, C. The role of low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) in comparison with whole egg yolk for sperm cryopreservation in rhesus monkeys. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, p. 459–464, 2011.

DONOVAN, A., HANRAHAN, J.P., KUMMEN, E., DUFFY, P., BOLAND, M.P. Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed semen at a natural or synchronized oestrus. **Animal Reproduction Science** V. 84, p. 359–368, 2004.

DRESSER, G.K.; WACHER, V.; WONG, S.; WONG, H.T.; BAILEY, D.G. Evaluation of peppermint oil and ascorbyl palmitate as inhibitors of cytochrome P4503A4 activity in vitro and in vivo. **Clinical Pharmacology Therapeutics**, v. 72, p. 247–255, 2002.

EIMAN, M.; ABOAGLA, E.; TERADA, T. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. **Theriogenology**, v. 62, p. 1160–1172, 2004.

EL-HAMID, I.S.A.; KHALIFA, M.A.; SHEDEED, H.A.; RATEB, S.A. Cryosurvival of ram spermatozoa after supplementing the diluent with L-ascorbic acid or α -tocopherol. **International Journal of Veterinary Science**, v. 7, p. 197–204, 2018.

ENGEL, S; SCHREINER, T; PETZOLDT, R. Lipid peroxidation in human spermatozoa and maintenance of progressive sperm motility. **Andrologia**, v. 31, n.1, p. 17-22, 1999.

FANG, Y.; ZHONG, R. Effect of oxidative stress on spermatozoa and male fertility. In **Free Radical Medicine and Biology**, 1st ed.; Das, K. IntechOpen. 22p. 2019.

FARSHAD, A.; KHALILI, B.; JAFAROGHLI, M. Effects of Butylated Hydroxytoluene on Freezability of Ram Spermatozoa. **Asian-Australasian Journal Animal Sciences**, v. 23, n. 10, p. 1276 – 1281, 2010.

FISER, P. S.; FAIRFULL, R. W. The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of spermatozoa frozen in straws. **Cryobiology**, v.21, p.542–551, 1984.

FISER, P. S.; FAIRFULL, R. W. Effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. **Cryobiology**, v.23, n.6, p.518-524, 1986.

FISER, P. S.; FAIRFULL, R. W.; MARCUS, G. J. The Effect of Thawing Velocity on Survival and Acrosomal Integrity of Ram Spermatozoa Frozen at Optimal and Suboptimal Rates in Straws. **Cryobiology**, v. 23, p. 141-149, 1986.

FIGUERÉDO, E. L. **Avaliação *in vitro* e *in vivo* do sêmen ovino resfriado em diluidores à base de água de coco no Estado do Ceará**. 2006. 112p.Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Estadual do Ceará Universidade Estadual do Ceará, Ceará, 2006.

FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A.; MAFFILI, V. V.; BORGES, A. M.; SANTOS, A. D. F.; RODRIGUES, M. T.; OLIVEIRA, R. F. M. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. **Animal Reproduction**, v. 2, n.2, p. 139-144, 2005.

FOROUZANFAR, M.; SHARAFI, M.; HOSSEINI, S. M.; OSTADHOSSEINI, S.; HAJIAN, M.; HOSSEINI, L.; ABEDI, P.; NILI, N.; RAHMANI, H. R.; NASR-ESFAHANI, M. H. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. **Theriogenology**, v. 73, p. 480–487, 2010.

FOULKES, J.A. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 49, p. 277-284, 1977.

GADEA, J. N.; GARCÍA-VAZQUEZ, F.; MATÁS, C.; GARDÓN, J. C.; CÁNOVAS, S.; GUMBAO, D. Cooling and Freezing of Boar Spermatozoa: Supplementation of the Freezing Media With Reduced Glutathione Preserves Sperm Function. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 3, p. 396-404, 2005.

GALARZA, D.A.; LÓPEZ-SEBASTÍAN, A.; SANTIAGO-MORENO, J. Supplementing a skimmed milk-egg yolk-based extender with L-carnitine helps maintain the motility, membrane integrity and fertilizing capacity of chilled ram sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55, p. 805–813, 2020.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozoide e plasma seminal. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7. Ed. São Paulo: Manole, 2004.

GIBB, Z.; GRIFFIN, R.A.; AITKEN, R.J.; IULIIS, G.N. Functions and effects of reactive oxygen species in male infertility. **Animal Reproduction Science**, v. 220, 2020.

GIL, J. RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M. SÖDERQUIST, L. RODRIGUES-MARTINEZ, H. Influence of centrifugation or low extension rates before freezing on the fertility of ram semen after cervical insemination. **Theriogenology**, v. 57, p. 1781-1792, 2002.

GRAHAM, E. F. Fundamentals of the preservation of spermatozoa. In: **The Integrity of Frozen Spermatozoa**. 1. Ed. Washington, D. C.: National academy of sciences, 1978.

GRAHAM, J.K.; HAMMERSTEDT, R.H. Differential effects of butylated hydroxytoluene analogs on bull sperm subjected to cold-induced membrane stress. **Cryobiology**, v. 29, p. 106–117, 1992.

HAFEZ, E. S. E. Preservação e criopreservação de gametas e embriões. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7. Ed. São Paulo: Manole, 2004.

HANADA, H. Disruption of vitamin E and butylated hydroxytoluene antioxidant function in response to paraquat-induced chromosomal damage in cultures of Anuran leukocytes. **Biology And Medicine**, v.7, p. 222, 2015.

HAMMERSTEDT, R.H.; AMANN, R.P.; RUCINSKY, T.; MORSE II, P.D.; LEPOCK, J.; SNIPES, W.; KEITH, A.D. Use of spin and electron spin resonance spectroscopy to characterize membranes of bovine sperm: effect of butylated hydroxytoluene and cold shock. **Biology of Reproduction**, v. 14, p. 381–397, 1976.

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p. 343-352, 1990.

HEZAVEHEI, M.; SHARAFI, M.; KOUCHESFAHANI, H.M.; HENKEL, R.; AGARWAL, A.; ESMAEILI, V.; SHAHVERDI, A. Sperm cryopreservation: a review on current molecular cryobiology and advanced approaches. **Reproductive Biomedicine**, v. 37, p. 327–339, 2018.

HIDALGO, M.; RODRIGUEZ, I.; DORADO, J.; SANZ, J.; SOLER, C. Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. **Veterinary Medicine**, v. 50, n. 1, p. 24-32, 2005.

HOLT, W. V.; NORTH, R. D. Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transitions in ram spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 91, p. 451-461, 1991.

HU, J. H.; LI, Q. W.; LI, G.; CHEN, X. Y.; ZANG, S. S.; WANG, L. Q. The Cryoprotective Effect on Frozen-thawed Boar Semen of Egg Yolk Low Density Lipoproteins. **Asian-Australasian Journal Animal Sciences**, v. 19, n. 4, p. 486-494, 2006.

HU, J. H.; ZAN, L. S.; ZHAO, X. L.; LI, Q. W.; JIANG, Z. L.; LI, Y. K.; LI, X. Effects of trehalose supplementation on semen quality and oxidative stress variables in frozen-thawed bovine semen. **Journal Animal Science**, v. 88, p. 1657–1662, 2010.

HU, J.H.; LI, Q.W.; ZAN, L.S.; JIANG, Z.L.; AN, J.H.; WANG, L.Q.; JIA, Y.H. The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing. **Animal Reproduction Science**, v. 117, p. 11–17, 2010.

HU, J. H.; JIANG, Z. L.; LV, R. K.; LI, Q. W.; ZANG, S. S.; ZAN, L. S.; LI, Y. K.; LI, X. The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. **Cryobiology**, v. 62, p. 83-87, 2011.

JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents. **WHO Food Additives Series**, n. 5. Seventeenth Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva, 1974.

JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VEN, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M. CRABO, B. G.; ZANEVELD, L. J. D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal Reproduction Fertility**, v.70, p.219-228, 1984.

JOHNSON, L. A.; WEITZE, K. F.; FISER, P.; MAXWELL, W. M. C. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 143–172, 2000.

KERSHAW C. M., KHALID M., MCGOWAN M. R., INGRAM K., LEETHONGDEE S., WAX G., SCARAMUZZI R. J. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. **Theriogenology**, v. 64, p. 1225–1235, 2005.

KHALIFA, T. A. A.; LYMBEROPOULOS, A. G.; EL-SAYDY, B. E. Testing Usability of Butylated Hydroxytoluene in Conservation of Goat Semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 525–530, 2008.

KULAKSIZ, R.; ÇEBİ, Ç.; AKÇAY, E.; DASKIN, A. The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram semen. **Small Ruminant Research**, v. 88, p. 12–15, 2010.

KURMA, D; JOSHI, A.; NAQVI, S. M. K. Effect of post-thaw incubation on semen characteristics of ram spermatozoa cryopreserved under controlled and uncontrolled rate of cooling. **Animal Reproduction**, v.6, n.4, p. 526-534, 2009.

LEAHY, T; GADELLA, B. M. Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. **Society for Reproduction and Fertility**, v.142, p. 759-778, 2011.

LIMA, L. F. **Influência de sistemas de refrigeração sobre a qualidade do sêmen ovino criopreservado em palhetas**. 2008. 53p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Brasília, 2008.

LOAIZA-ECHEVERRI, A.M.; CRUZ, B.C.; SNOECK, P.P.N.; MOURA, L.C.O.; NEVEZ, B.P.; NEVEZ, M.M.; HENEINE, L.G.D.; HENRY, M. Low density lipoproteins added to an extender frozen or lyophilized are evenly efficient in cryoprotecting ovine sperm cells than when 16% egg yolk was added. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, p. 1335–1346, 2015.

LOVELOCK, J. E.; POLGE, C. The Immobilization of Spermatozoa by Freezing and Thawing and the Protective Action of Glycerol. **Immobilization of Spermatozoa by Freezing**, v. 58, p. 618-622, 1954.

LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. **Reproductive Biology**, v. 5, n. 1, p. 5-17, 2005.

MACÍAS GARCÍA, B.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; APARICIO, I. M.; MIRÓ-MORÁN, A.; MORILLO RODRIGUEZ, A.; GALLARDO BOLAÑOS, J. M.; GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, L.; BALAO DA SILVA, C. M.; RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, H.; TAPIA, J. A.; PEÑA, F. J. Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa: Effects on membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential. **Theriogenology**, v. 77, p. 1280–1289, 2012.

MAIA, M. S.; BICUDO, S. D.; SICHERLE, C. C.; RODELLO, L.; GALLEGOS, I. C. S. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v. 122, p. 118-123, 2010.

MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MÉNARD, M. Major Proteins of Bovine Seminal Plasma Bind to the Low-Density Lipoprotein Fraction of Hen's Egg Yolk. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1250–1258, 2002.

MARCO-JIMÉNEZ, F.; PUCHADES, S.; GADEA, J.; VICENTE, J.S. VIUDES-DECASTRO, M.P. Effect of semen collection method on pre- and post-thaw Guirra ram spermatozoa. **Theriogenology**, v.64, p.1756-1765, 2005.

MARTI, E.; MARTI, J. I.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Effect of the Cryopreservation Process on the Activity and Immunolocalization of Antioxidant Enzymes in Ram Spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 29, n. 4, p. 459-467, 2008.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal Physiological**, v. 247, p. 125-142, 1984.

MELO, C. **M.AÇÃO DOS CRIOPROTETORES NA BIOTECNOLOGIA DE SÊMEN CONGELADO**. 2003. 19p. Seminário (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu-São Paulo, 2003.

MELO, M. I. V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen eqüino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 1, p. 71-78, 1999.

MEMON, A.A.; WAHID, H.; ROSNINA, Y.; GOH, Y.M.; EBRAHIMI, M.; NADIA, F.M.; AUDREY, G. Effect of butylated hydroxytoluene on cryopreservation of Boer goat semen in Tris egg yolk extender. **Animal Reproduction Sciences**, v. 129, p. 44–49, 2011.

MERINO, O.; AGUAGÜIÑA, W.E.; ESPONDA, P.; RISOPATRÓN, J.; ISACHENKO, E.; ISACHENKO, V.; SÁNCHEZ, R. Protective effect of butylated hydroxytoluene on sperm function on human spermatozoa cryopreserved by vitrification technique. **Andrologia**, v. 47, p. 186–193, 2015.

MICLEA, V.; DASCAL-CIORNEI, A.; ZAHAN, M.; DASCAL-CIORNEI, V.; MICLEA, I. The Influence of the Dilution Rate and Glycerol Concentration on Ram Semen Preservation. **Animal Science and Biotechnologies**, v. 67, p. 260-265, 2010.

MORRIER, A.; CASTONGUAY, F.; BAILEY, J. L. Glycerol addition and conservation of fresh and cryopreserved ram spermatozoa. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 82, p. 347–356, 2002.

MORRIS, G.J.; FASZER, K.; GREEN, J.E.; DRAPER, D.; GROUT, B.W.W.; FONSECA, F. Rapidly cooled horse spermatozoa: loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation. **Theriogenology**, v. 68, p. 804–812, 2007

MOURA, L.C.O.; SILVA M.C.; SNOECK, P.P.N. Diferentes soluções de teste hiposmótico para sêmen ovino. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 32, n. 3, p.146-150, 2010.

MOUSTACAS, V. S.; ZAFFALON, F. G.; LAGARES, M. A.; LOAIZA-ECHEVERRI, A. M.; VARAGO, F. C.; NEVES, M. M.; HENEINE, L. G. D.; ARRUDA, R. P.; HENRY, M. Natural, but not lyophilized, low density lipoproteins were an acceptable

alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen. **Theriogenology**, v. 75, p. 300-307, 2011.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A. et al. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by a easy method: crioprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.57, p.1695-1706, 2002.

NAIJIAN, H.R.; KOHRAM, H.; SHAHNEH, A.Z.; SHARAFI, M.; BUCAK, M.N. Effects of different concentrations of BHT on microscopic and oxidative parameters of Mahabadi goat semen following the freeze-thaw process. **Cryobiology**, v. 66, p. 151–155, 2013.

NAJAFI, A.; ZHANDI, M.; TOWHIDI, A.; SHARAFI, M.; SHARAF, A.A.; MOTLAGH, M.K.; MARTINEZ-PASTOR, F. Trehalose and glycerol have a dose-dependent synergistic effect on the post-thaw quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. **Cryobiology**, v. 66, p. 275–282, 2013.

NEAGU, V.R.; GARCÍA, B.M.; SANDOVAL, C.S.; RODRÍGUEZ, A.M.; FERRUSOLA, C.O.; FERNÁNDEZ, L.G.; TAPIA, J.A.; PEÑA, F.J. Freezing dog semen in presence of the antioxidant butylated hydroxytoluene improves post-thaw sperm membrane integrity. **Theriogenology**, v. 73, p. 645–650, 2010.

NEVES, M. M. **Extração das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo de Gallus domesticus e sua aplicação na criopreservação do sêmen canino**. 2008. Tese (Doutorado em Ciência Animal) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

NEVES, J. P.; NUNES, J. F.; MORAES, J. C. F.; SOUZA, C. J. H.; SALGUEIRO, C. C. M.; ALMEIDA, J. L. Inseminação artificial em pequenos ruminantes. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. Ed. São Paulo: Roca, 2008.

NEVES, M.M.; HENEINE, L.G.D.; HENRY, M. Cryoprotection effectiveness of low concentration of natural lyophilized ldl (low density lipoproteins) on canine spermatozoa. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, p. 769–777, 2014.

OBERST, E. R.; JOBIM, M. I. M.; MATTOS, R. C.; KROTH, E. LARA, G.; SMIDERIE, W.; BRONZATTO, M. Teste hiposmótico e sua relação com outros métodos da avaliação da integridade da membrana espermática do carneiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.375-376, 2003.

OKU, K.; WATANABE, H.; KUBOTA, M.; FUKUDA, S.; KURRIMOTO, M.; TSUJISAKA, Y.; KOMORI, M.; INOUE, Y.; SAKURAI, M. NMR and quantum study of the OH^{δ-}π and CH^{δ-}O interactions between trehalose and unsaturated fatty acids: implication for the mechanism of antioxidant function of trehalose. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, p. 12739–12748, 2003.

OLLERO, M.; BESCÓS, O.; CEBRIÑ-PEREZ, J. A.; MUISO-BLANCO, T. Loss of plasma membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing-thawing process. **Theriogenology**, v. 49, p. 547-555, 1998.

PACE, M. M.; GRAHAM, E. F. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. **Journal of Animal Science**, v. 39, n. 6, p. 1144-1149, 1974.

PALOMO, M.J.; GARCIA, W.; TABAREZ, A. Effect of seminal plasma and butylated hydroxytoluene (BHT) concentration on ram sperm freezability. **Small Ruminant Research**, v.153, p. 66–70, 2017.

PARKS, J. E.; HAMMERSTEDT, R. H. Developmental Changes Occurring in the Lipids of Ram Epididymal Spermatozoa Plasma Membrane. **Biology of Reproduction**, v. 32, n. 65, p.653-668, 1985.

PARTYKA, A.; LUKASZEWICZ, E.; NIZANSKI, W. Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. **Theriogenology**, v. 77, p. 1497–1504, 2012.

PEÑA, F. J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRIGUEZ MARTINEZ, H. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 85–98, 2003.

PERIS, S. I.; MORRIER, A.; DUFOUR, M.; BAILEY, J. L. Cryopreservation of Ram Semen Facilitates Sperm DNA Damage: Relationship Between Sperm Andrological Parameters and the Sperm Chromatin Structure Assay. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 2, p. 224-233, 2004.

PERUMAL, P.; SRIVASTAVA, S.K.; GHOSH, S.K.; BARUAH, K.K.; BAG, S.; RAJORIA, J.S.; KUMAR, K.; RAJKHOWA, C.; PANDE, M.; SRIVASTAVA, N. Effects of low-density lipoproteins as additive on quality parameters and oxidative stress following cryopreservation of mithun (*Bos frontalis*) spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, p. 708–716, 2016.

PICKETT, B. W. Seminal extenders and cooled semen. In: MCKINNON, A. O.; VOSS J. L. **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 715-745, 1992.

PILLET, E.; DUCHAMP, G.; BATELLIER, F.; BEAUMAL, V.; ANTON, M.; DESHERCES, S.; SCHMITT, E.; MAGISTRINI, M. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. **Theriogenology**, v. 75, p. 105–114, 2011.

PINI, T.; FARMER, K.; DRUART, X.; TEIXEIRA-GOMES, A.P.; TSIKIS, G.; LABAS, V.; LEAHY, T.; DE GRAAF, S.P. Binder of sperm proteins protect ram spermatozoa from freeze-thaw damage. **Cryobiology**, v. 82, p. 78–87, 2018.

PINI, T.; LEAHY, T.; DE GRAAF, S.P. Sublethal sperm freezing damage: manifestations and solutions. **Theriogenology**, v. 188, p. 172–181, 2018.

PERIS-FRAU, P.; SOLER, A.J.; INIESTA-CUERDA, M.; MARTÍN-MAESTRO, A.; SÁNCHEZ-AJOFRÍN, I.; MEDINA-CHÁVEZ, D.A.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; MONTORO, V.; GARDE, J.J. Sperm cryodamage in ruminants: understanding the molecular changes induced by the cryopreservation process to optimize sperm quality. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21:2781, p. 1-22, 2020.

ÖZTÜRK, A.E.; BODU, M.; BUCAK, M.N.; AGIR, V.; ÖZCAN, A.; KESKIN, N.; ILI, P.; TOPRAGGALEH, T.R.; SIDAL, H.; BASPINAR, N.; DURSUN, S. The synergistic effect of trehalose and low concentration of cryoprotectants can improve post-thaw ram sperm parameters. **Cryobiology**, v. 95, p. 157–163, 2020.

POULOS, A.; DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I. G. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 46B, p. 541-549, 1973a.

POULOS, A.; VOGLMAYR, J. K., A.; WHITE, I. G. Phospholipid changes in spermatozoa during passage through the genital tract of the bull. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 306, p. 194-202, 1973b.

PRAPAIWAN, N.; PUNJACHAIPORNPOL, S.; YAMTANG, D.; THARASANIT, T.; KAEOKET, K.; MANEE-IN, S. Effects of Low-density Lipoprotein on the Quality of Canine Epididymal Spermatozoa following Freezing and Thawing. **Thai Journal of Veterinary Medicine Supplement**, v. 41, p. 146-147, 2011.

ROSTAMI, B.; EBRAHIMI, D.; SADEGHIPANAH, H.; MASOUMI, R.; SHAHIR, M.H. Effects of supplementation of tris-egg yolk extender with different sugars and antioxidants on freezability of ram semen. **Cryobiology**, v.92, 62–66, 2020.

QUINN, P. J.; CHOW, P. Y. W; WHITE, I. G. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 60, p. 403-407, 1980.

QUINTELA, A. T.; OLIVEIRA, I. R. S.; SOUZA, A. O.; GUSMÃO, A. L.; SILVA, A. R. Water-induced hypo-osmotic test for the evaluation of canine sperm membrane integrity. **Animal Reproduction**, v. 7, n. 2, p. 70-74, 2010.

REICHENBACH, H. D.; MORAES, J. C. F.; NEVES, J. P. Tecnologia do sêmen e inseminação artificial em bovinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. Ed. São Paulo: Roca, 2008.

RHEMREV, J. P. T.; VERMEIDEN, J. P. W.; HAENEN, G. R. M. M.; DE BRUIJNE, J. J.; REKERS-MOMBARG, L. T. M.; BAST, A. Progressively motile human spermatozoa are well protected against *in vitro* lipid peroxidation imposed by induced oxidative stress. **Andrologia**, v. 33, p. 151-158, 2001.

RICKER, J.V.; LINFOR, J.J.; DELFINO, W.J.; KYSAR, P.; SCHOLTZ, E.L.; TABLIN, F.; CROWE, J.H.; BALL, B.A.; MEYERS, S.A. Equine Sperm Membrane Phase

Behavior: The Effects of Lipid-Based Cryoprotectants. **Biology of Reproduction**, v. 74, p. 359-365, 2006.

ROBAYO, I.; MONTENEGRO, V.; VALDES, C.; COX, J. F. CASA Assessment of Kinematic Parameters of Ram Spermatozoa and their Relationship to Migration Efficiency in Ruminant Cervical Mucus. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 393-399, 2008.

ROCA, J.; GIL, M. A.; HERNANDEZ, M.; PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A. Survival and fertility of boar Spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 3, 2004.

RUBIO-GUILLÉN, J. L.; QUINTERO-MORENO, A. A.; GONZÁLEZ VILLALOBOS, D. M. Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. **Revista Científica**, Facultad Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia, v. 19, n. 4, p. 382 - 389, 2009.

SAID, L.; SAAD, A.; CARREAU, S. Differential expression of mRNA aromatase in ejaculated spermatozoa from infertile men in relation to either asthenozoospermia or teratozoospermia. **Andrologia**, v. 46, p. 136–146, 2014.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 77–111, 2000.

SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v. 48, n. 6, p. 835-850, 1996.

SARASWAT, S.; JINDAL, S. K.; PRIYADHARSINI, R.; RAMACHANDRAN, N.; YADAV, S.; ROUT, P. K.; KHARCHE, S. D.; GOEL, A. K. The Effect of Antioxidants Supplementation to Cryopreservation Protocol on Seminal Attributes and Sperm Membrane Characteristics in Sirohi Goat. **Journal of Physiology and Pharmacology Advances**, v. 2, n. 1, p. 49-58, 2012.

SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W.F. Sperm membrane behaviour during cooling and cryopreservation. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 50 (Suppl. 3), p. 20-26, 2015.

SIKKA, S. C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 1, p. 5-18, 2004.

SILVA, M. C. **Tempo de equilíbrio e sua influência na criopreservação de sêmen ovino em diluidores contendo lipoproteína de baixa densidade**. 2011. 55p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-Bahia, 2011.

SILVA, M.C.; MOURA, L.C.O.; MELO, M.I.V.; MAMBRINI, J.V.M.; NEVES, M.M.; HENRY, M.R.J.M.; SNOECK, P.P.N. Prolonged post cooling but not pre-cooling equilibrium length improves the viability of ram sperm cryopreserved in an extender containing low-density lipoproteins. **Small Ruminants Research**, v. 119, p. 88–95, 2014.

SILVA, S. V.; SOARES, A. T.; BATISTA, A. M.; ALMEIDA, F. C.; NUNES, J. F.; PEIXOTO, C. A.; GUERRA, M. M. P. In Vitro and In Vivo Evaluation of Ram Sperm Frozen in Tris Egg-yolk and Supplemented with Superoxide Dismutase and Reduced Glutathione. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 874–881, 2011.

SNOECK, P.P.N.; MOURA, L.C.O.; CLEMENTE, C.A.A.; LOAIZA-ECHEVERRI, A.M.; NEVES, M.M.; ALLAMAN, I.B.; HENRY, M. Effects of catalase, superoxide dismutase and reduced glutathione in LDL extender on ovine cryopreserved sperm viability. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, p. 2593–2602, 2015.

SÖNMEZ, M.; DEMIRCI, E. The effect of ascorbic acid on the freezability of ram semen diluted with extenders containing different proportions of glycerol. **Turkish Journal Veterinary Animal Sciences**, v. 28, p. 893–899, 2004.

SUDJARWO, S.; AUUCKY, H.; ZAINI, N. C. The role of oxidative phosphorylation the mechanism of humam sperm motility regulation. **Berkala Penelitian Hayati**, v. 12, n. 1, p. 87-91, 2006.

TERRILL, C. E. Comparison of ram semen collection obtained by three different methods for artificial insemination. **The American Society of Animal Production**, p. 201–207, 1940.

TREMELLEN, K. Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. **Human Reproduction Update**, v.14, n.3 p. 243–258, 2008.

TONIETO, R. A.; GOULARTE, K. L.; GASTAL, G. D. A.; SCHIAVON, R. S.; DESCHAMPS, J. C.; LUCIA JR, T. Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. **Small Ruminant Research**, v. 93, p. 206–209, 2010.

TREMELLEN, K. Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. **Human Reproduction Update**, v.14, n.3 p. 243–258, 2008.

TURNER, R.M. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, p. 25-38, 2006.

UGUR, M.R.; ABDELRAHMAN, A.S.; EVANS, H.C.; GILMORE, A.A.; HITIT, M.; ARIFIANTINI, R.I.; PURWANTARA, B.; KAYA, A.; MEMILI, E. Advances in cryopreservation of bull sperm. **Frontier In Veterinary Science**, v.6:268 p. 1-15, 2019.

VALENTE, S. I. S. **Criopreservação de sêmen ovino: comparação entre dois diluidores**. 2007. Dissertação (Trabalho de Conclusão de Curso). Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. 2007.

VARELA, E.; ROJAS, M.; RESTREPO, G. Membrane stability and mitochondrial activity of bovine sperm frozen with low-density lipoproteins and trehalose. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 55, 146–153, 2020.

VERA-MUNOZ, O.; AMIRAT-BRIAND, L.; BENCHARIF, D.; ANTON, M.; DESHERCES, S.; SHMITT, E.; THORIN, C.; TAINURIER, D. Effect of low-density lipoproteins, spermatozoa concentration and glycerol on functional and motility parameters of bull spermatozoa during storage at 4 °C. **Asian Journal of Andrology**, v.13, p. 281-286, 2011.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 23-53, 2000.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assesment of their postthawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, p.871-891, 1995.

WATSON, P. F.; ANDERSON, W. J. Influence of butylated hydroxytoluene (BHT) on the viability of ram spermatozoa undergoing cold shock. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 69, p. 229-235, 1983.

WOLFE, C. A.; JAMES, P. S.; MACKIE, A. R.; LADHA S.; JONES R. Regionalized Lipid Diffusion in the Plasma Membrane of Mammalian Spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1506-1514, 1998.

YÁNIZ, J. L.; SANTOLARIA, P.; MARCO-AGUADO, M^a. A. LÓPEZ-GATIUS, F. Use of image analysis to assess the plasma membrane integrity of ram spermatozoa in different diluents. **Theriogenology**, v. 70, p. 192-198, 2008.

YU L, YANG X, MA B, YING H, SHANG X, HE B, ZHANG Q. Abnormal arachidonic acid metabolic network may reduce sperm motility via P38 MAPK. **Open Biology**, V. 9: 180091, p. 1-9, 2019.

ZÚCCARI, C. E. S. N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina**. 1998, 121 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.



ANEXO

Formatação e Estruturação do Artigo Segundo a Revista Animals

Manuscript Preparation

General Considerations

Research manuscripts should comprise:

Front matter: Title, Author list, Affiliations, Abstract, Keywords

Research manuscript sections: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions.

Back matter: Supplementary Materials, Acknowledgments, Author Contributions, Conflicts of Interest, **References**.

Review manuscripts should comprise the **front matter**, literature review sections and the **back matter**. The template file can also be used to prepare the front and back matter of your review manuscript. It is not necessary to follow the remaining structure. Structured reviews and meta-analyses should use the same structure as research articles and ensure they conform to the **PRISMA** guidelines.

Graphical Abstract:

A graphical abstract (GA) is an image that appears alongside the text abstract in the Table of Contents. In addition to summarizing content, it should represent the topic of the article in an attention-grabbing way.

The GA should be a high-quality illustration or diagram in any of the following formats: PNG, JPEG, EPS, SVG, PSD or AI. Written text in a GA should be clear and easy to read, using one of the following fonts: Times, Arial, Courier, Helvetica, Ubuntu or Calibri.

The minimum required size for the GA is 560 × 1100 pixels (height × width). When submitting larger images, please make sure to keep to the same ratio.

Abbreviations should be defined in parentheses the first time they appear in the abstract, main text, and in figure or table captions and used consistently thereafter.

SI UnitsInternational System of Units) should be used. Imperial, US customary and other units should be converted to SI units whenever possible.

Accession numbersof RNA, DNA and protein sequences used in the manuscript should be provided in the Materials and Methods section. Also see the section on [Deposition of Sequences and of Expression Data](#).

Equations:If you are using Word, please use either the Microsoft Equation Editor or the MathType add-on. Equations should be editable by the editorial office and not appear in a picture format.

Research Data and supplementary materials:Note that publication of your manuscript implies that you must make all materials, data, and protocols associated with the publication available to readers. Disclose at the submission stage any restrictions on the availability of materials or information. Read the information about [Supplementary Materials](#) and Data Deposit for additional guidelines.

Preregistration:Where authors have preregistered studies or analysis plans, links to the preregistration must be provided in the manuscript.

Guidelines and standards: MDPI follows standards and guidelines for certain types of research. See https://www.mdpi.com/editorial_process for further information.

Front Matter

These sections should appear in all manuscript types.

Title:The title of your manuscript should be concise, specific and relevant. It should identify if the study reports (human or animal) trial data, or is a systematic review, meta-analysis or replication study. When gene or protein names are included, the abbreviated name rather than full name should be used.

Author List and Affiliations:Authors' full first and last names must be provided. The initials of any middle names can be added. The PubMed/MEDLINE standard format is used for affiliations: complete address information including city, zip code,

state/province, and country. At least one author should be designated as corresponding author, and his or her email address and other details should be included at the end of the affiliation section. Please read the [criteria to qualify for authorship](#).

Simple Summary: It is vitally important that scientists are able to describe their work simply and concisely to the public, especially in an open-access on-line journal. The simple summary consists of no more than 200 words in one paragraph and contains a clear statement of the problem addressed, the aims and objectives, pertinent results, conclusions from the study and how they will be valuable to society. This should be written for a lay audience, i.e., no technical terms without explanations. No references are cited and no abbreviations. Submissions without a simple summary will be returned directly. Example could be found at <https://www.mdpi.com/2076-2615/6/6/40/htm>.

Abstract: The abstract should be a total of about 200 words maximum. The abstract should be a single paragraph and should follow the style of structured abstracts, but without headings: 1) Background: Place the question addressed in a broad context and highlight the purpose of the study; 2) Methods: Describe briefly the main methods or treatments applied. Include any relevant preregistration numbers, and species and strains of any animals used. 3) Results: Summarize the article's main findings; and 4) Conclusion: Indicate the main conclusions or interpretations. The abstract should be an objective representation of the article: it must not contain results which are not presented and substantiated in the main text and should not exaggerate the main conclusions.

Keywords: Three to ten pertinent keywords need to be added after the abstract. We recommend that the keywords are specific to the article, yet reasonably common within the subject discipline.

Research Manuscript Sections

Introduction: The introduction should briefly place the study in a broad context and highlight why it is important. It should define the purpose of the work and its significance, including specific hypotheses being tested. The current state of the

research field should be reviewed carefully and key publications cited. Please highlight controversial and diverging hypotheses when necessary. Finally, briefly mention the main aim of the work. Keep the introduction comprehensible to scientists working outside the topic of the paper.

Materials and Methods: They should be described with sufficient detail to allow others to replicate and build on published results. New methods and protocols should be described in detail while well-established methods can be briefly described and appropriately cited. Give the name and version of any software used and make clear whether computer code used is available. Include any pre-registration codes.

Results: Provide a concise and precise description of the experimental results, their interpretation as well as the experimental conclusions that can be drawn.

Discussion: Authors should discuss the results and how they can be interpreted in perspective of previous studies and of the working hypotheses. The findings and their implications should be discussed in the broadest context possible and limitations of the work highlighted. Future research directions may also be mentioned. This section may be combined with Results.

Conclusions: This section is mandatory, and should provide readers with a brief summary of the main conclusions.

Patents: This section is not mandatory, but may be added if there are patents resulting from the work reported in this manuscript.

Back Matter

Supplementary Materials: Describe any supplementary material published online alongside the manuscript (figure, tables, video, spreadsheets, etc.). Please indicate the name and title of each element as follows Figure S1: title, Table S1: title, etc.

Funding: All sources of funding of the study should be disclosed. Clearly indicate grants that you have received in support of your research work and if you received funds to cover publication costs. Note that some funders will not refund article

processing charges (APC) if the funder and grant number are not clearly and correctly identified in the paper. Funding information can be entered separately into the submission system by the authors during submission of their manuscript. Such funding information, if available, will be deposited to FundRef if the manuscript is finally published.

Please add: “This research received no external funding” or “This research was funded by [name of funder] grant number [xxx]” and “The APC was funded by [XXX]” in this section. Check carefully that the details given are accurate and use the standard spelling of funding agency names at <https://search.crossref.org/funding>, any errors may affect your future funding.

Acknowledgments:In this section you can acknowledge any support given which is not covered by the author contribution or funding sections. This may include administrative and technical support, or donations in kind (e.g., materials used for experiments).

Author Contributions:Each author is expected to have made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data; or the creation of new software used in the work; or have drafted the work or substantively revised it; AND has approved the submitted version (and version substantially edited by journal staff that involves the author’s contribution to the study); AND agrees to be personally accountable for the author’s own contributions and for ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work, even ones in which the author was not personally involved, are appropriately investigated, resolved, and documented in the literature.

For research articles with several authors, a short paragraph specifying their individual contributions must be provided. The following statements should be used "Conceptualization, X.X. and Y.Y.; Methodology, X.X.; Software, X.X.; Validation, X.X., Y.Y. and Z.Z.; Formal Analysis, X.X.; Investigation, X.X.; Resources, X.X.; Data Curation, X.X.; Writing – Original Draft Preparation, X.X.; Writing – Review & Editing, X.X.; Visualization, X.X.; Supervision, X.X.; Project Administration, X.X.; Funding

Acquisition, Y.Y.”, please turn to the [CRediT taxonomy](#) for the term explanation. For more background on CRediT, see [here](#). **Authorship must include and be limited to those who have contributed substantially to the work. Please read the section concerning the [criteria to qualify for authorship](#) carefully**".

Institutional Review Board Statement: In this section, please add the Institutional Review Board Statement and approval number for studies involving humans or animals. Please note that the Editorial Office might ask you for further information. Please add “The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of NAME OF INSTITUTE (protocol code XXX and date of approval).” OR “Ethical review and approval were waived for this study, due to REASON (please provide a detailed justification).” OR “Not applicable” for studies not involving humans or animals. You might also choose to exclude this statement if the study did not involve humans or animals.

Data Availability Statement: In this section, please provide details regarding where data supporting reported results can be found, including links to publicly archived datasets analyzed or generated during the study. Please refer to suggested Data Availability Statements in section “[MDPI Research Data Policies](#)”. You might choose to exclude this statement if the study did not report any data.

Conflicts of Interest: Authors must identify and declare any personal circumstances or interest that may be perceived as influencing the representation or interpretation of reported research results. If there is no conflict of interest, please state "The authors declare no conflict of interest." Any role of the funding sponsors in the choice of research project; design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results must be declared in this section. *Animals* does not publish studies funded by the tobacco industry. Any projects funded by industry must pay special attention to the full declaration of funder involvement. If there is no role, please state “The sponsors had no role in the design, execution, interpretation, or writing of the study”. For more details please see [Conflict of Interest](#).

References:References must be numbered in order of appearance in the text (including table captions and figure legends) and listed individually at the end of the manuscript. We recommend preparing the references with a bibliography software package, such as [EndNote](#), [ReferenceManager](#) or [Zotero](#) to avoid typing mistakes and duplicated references. We encourage citations to data, computer code and other citable research material. If available online, you may use reference style 9. below. Citations and References in Supplementary files are permitted provided that they also appear in the main text and in the reference list.

In the text, reference numbers should be placed in square brackets [], and placed before the punctuation; for example [1], [1–3] or [1,3]. For embedded citations in the text with pagination, use both parentheses and brackets to indicate the reference number and page numbers; for example [5] (p. 10). or [6] (pp. 101–105).

The reference list should include the full title, as recommended by the ACS style guide. Style files for [Endnote](#) and [Zotero](#) are available.

References should be described as follows, depending on the type of work:Journal Articles:

1. Author 1, A.B.; Author 2, C.D. Title of the article. *Abbreviated Journal Name* Year, Volume, page range.

Books and Book Chapters:

2. Author 1, A.; Author 2, B. *Book Title*, 3rd ed.; Publisher: Publisher Location, Country, Year; pp. 154–196.

3. Author 1, A.; Author 2, B. Title of the chapter. In *Book Title*, 2nd ed.; Editor 1, A., Editor 2, B., Eds.; Publisher: Publisher Location, Country, Year; Volume 3, pp. 154–196.

Unpublished work, submitted work, personal communication:

4. Author 1, A.B.; Author 2, C. Title of Unpublished Work. status (unpublished; manuscript in preparation).

5. Author 1, A.B.; Author 2, C. Title of Unpublished Work. *Abbreviated Journal Name*stage of publication (under review; accepted; in press).

6. Author 1, A.B. (University, City, State, Country); Author 2, C. (Institute, City, State, Country). Personal communication, Year.

Conference Proceedings:

7. Author 1, A.B.; Author 2, C.D.; Author 3, E.F. Title of Presentation. In *Title of the Collected Work* (if available), Proceedings of the Name of the Conference, Location of Conference, Country, Date of Conference; Editor 1, Editor 2, Eds. (if available); Publisher: City, Country, Year (if available); Abstract Number (optional), Pagination (optional).

Thesis:

8. Author 1, A.B. Title of Thesis. Level of Thesis, Degree-Granting University, Location of University, Date of Completion.

Websites:

9. Title of Site. Available online: URL (accessed on Day Month Year).

Unlike published works, websites may change over time or disappear, so we encourage you create an archive of the cited website using a service such as [WebCite](#).

Archived websites should be cited using the link provided as follows:

10. Title of Site. URL (archived on Day Month Year).

See the [Reference List and Citations Guide](#) for more detailed information.

Preparing Figures, Schemes and Tables

File for Figures and Schemes must be provided during submission in a single zip archive and at a sufficiently high resolution (minimum 1000 pixels width/height, or a resolution of 300 dpi or higher). Common formats are accepted, however, TIFF, JPEG, EPS and PDF are preferred.

Animals can publish multimedia files in articles or as supplementary materials. Please contact the editorial office for further information.

All Figures, Schemes and Tables should be inserted into the main text close to their first citation and must be numbered following their number of appearance (Figure 1, Scheme I, Figure 2, Scheme II, Table 1, *etc.*).

All Figures, Schemes and Tables should have a short explanatory title and caption.

All table columns should have an explanatory heading. To facilitate the copy-editing of larger tables, smaller fonts may be used, but no less than 8 pt. in size. Authors should use the Table option of Microsoft Word to create tables.

Authors are encouraged to prepare figures and schemes in color (RGB at 8-bit per channel). There is no additional cost for publishing full color graphics.