

Biotechnologias do sêmen – Presente e Futuro

Semen Biotechnology – Present and Future

**Aline Saraiva de Oliveira¹, Gustavo Ferrer Carneiro²,
Maria Madalena Pessoa Guerra^{2*}**

¹Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – RENORBIO; ²Laboratório de Andrologia (ANDROLAB), Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco

Resumo

A biotecnologia do sêmen tem como objetivo acelerar o melhoramento genético de rebanhos, mas, apesar de décadas de estudos visando aprimorar as diversas fases dos processos, ainda necessita de grandes avanços, visando reduzir os efeitos deletérios ocasionados pelo estresse térmico, osmótico e oxidativo. O uso de substâncias com propriedades antioxidantes adicionados aos diluentes de criopreservação e/ou sexagem de sêmen têm sido objeto de muitos estudos. No entanto, ainda não foi identificada uma substância ou uma associação de diferentes substâncias antioxidantes que possibilite reduzir os danos espermáticos, pós-processamento. Desta forma, considerando a possibilidade da nanotecnologia, associada ao uso de substâncias com capacidade de melhorar os diferentes processos, proporcionar melhor viabilidade espermática e, conseqüentemente, taxa de fertilidade dos espermatozoides, constitui-se numa ferramenta promissora para melhorar os resultados obtidos com o uso da biotecnologia do sêmen.

Palavras- chave: Criopreservação, sexagem, sêmen, antioxidantes, nanotecnologia.

Abstract

Semen biotechnology aims to accelerate genetic improvement of herds, however, despite decades of studies with the objective of improving different phases of the processes, it still requires major advances, to reduce harmful effects caused by thermal, osmotic and oxidative stress. The use of substances with antioxidant properties added to cryopreservation extenders and/or semen sexing has been subject of many studies. However, a substance or a combination of different antioxidant substances that makes it possible to reduce post-processing sperm damage has not yet been identified. Thus, considering the possibility of nanotechnology, associated with the use of substances with the capacity to improve different processes, provide better sperm viability and, consequently, sperm fertility rate. This will possibly constitute a promising tool to improve the results obtained with the use of semen biotechnology.

Keywords: Cryopreservation, sorting, semen, diluent, antioxidant, nanotechnology.

Introdução

As biotecnologias do sêmen, como refrigeração, congelação, vitrificação e sexagem espermática, possibilitam a maximização do potencial genético dos reprodutores. Dentre elas, a congelação é a mais utilizada na preservação da viabilidade espermática e, quando associada à inseminação artificial, permite a disseminação genética de animais zootecnicamente superiores, em grande escala e com menor custo de produção (Kumar et al., 2019). Em diferentes espécies, a utilização de sêmen congelado acarreta muitos benefícios, o que resulta em uma maior evidência a esta biotecnologia (Yanez-Ortiz et al., 2022).

Apesar da congelação do sêmen permitir sua utilização em tempo indeterminado, desde que as amostras sejam bem acondicionadas em temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, diversos fatores podem influenciar na fertilidade do sêmen congelado, como duração do processamento, temperatura de estocagem ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) e diluente utilizado (Ustuner et al., 2015), em virtude das mudanças repentinas de temperatura ocasionarem formação de cristais de gelo e afetarem a integridade dos espermatozoides (Salamon e Maxwell, 2000; Santos et al., 2015).

Além disso, diversos processos durante a congelação do sêmen, como choque térmico, exposição ao próprio oxigênio atmosférico ou remoção de plasma seminal (Watson, 2000), podem ocasionar desequilíbrio na produção e utilização de espécies reativas de oxigênio (ROS), que, embora necessárias

*Correspondência: madalena.guerra@ufrpe.br

Recebido: 29 de abril de 2023

Aceito: 25 de maio de 2023

para o processo de capacitação espermática, podem resultar em estresse oxidativo e, conseqüentemente, danos às células espermáticas (Souza et al., 2017), com redução da integridade de membrana e da motilidade progressiva dos espermatozoides (Santos et al., 2015).

Ressalta-se, ainda, que a diluição espermática diminui as concentrações de antioxidantes naturais encontrados no plasma seminal, culminando em desequilíbrio entre a produção de ROS e a concentração de antioxidantes (Nascimento et al., 2015). O aumento das reações oxidativas, como a peroxidação lipídica, causam danos às membranas plasmática e acrossomal, ao DNA (Comhaire et al., 1999; Guthrie e Welch, 2012), ao potencial de atividade mitocondrial e à capacidade fertilizante dos espermatozoides (Aitken et al., 2010).

Visando melhorar a viabilidade espermática pós-congelação, a adição de produtos com atividade antioxidante aos diluidores de sêmen vem mostrando ser uma alternativa, uma vez que sua utilização pode evitar lesões decorrentes do processo de oxidação (Sánchez-Rubio et al., 2020). A literatura mostra que muitos antioxidantes têm sido utilizados no diluente de criopreservação do sêmen (Majzoub e Agarwal, 2020). No entanto, os resultados ainda evidenciam a necessidade de identificar substâncias ou procedimentos que possam resultar no número elevado de gametas sobreviventes, com boa capacidade fertilizante (Stornelli et al., 2005). Por conseguinte, o uso da nanotecnologia como ferramenta de inovação tecnológica pode ser uma alternativa para aumentar a proteção dos espermatozoides durante a criopreservação e promover uma maior taxa de fertilização, uma vez que as nanoemulsões permitem a liberação controlada de seus constituintes, reduzindo a toxicidade de seus componentes (Hu et al., 2018; Vallet-Regi et al., 2018).

Criopreservação do sêmen

Apesar de ser bastante difundida e das inúmeras vantagens já conhecidas, a congelação do sêmen apresenta-se limitada, uma vez que o número de células espermáticas viáveis obtidas após descongelação ainda é reduzido, em virtude das diferentes alterações celulares ocasionadas ao longo do processamento (Jurado-Campos, 2023). Estes danos causados aos espermatozoides são oriundos das modificações químicas e físicas das membranas, nas quais são atribuídas alterações da fase lipídica e da peroxidação (Celeghini et al., 2008).

Alterações a nível estrutural e funcional ocasionam aos espermatozoides mudanças morfológicas, de motilidade e perda da sua viabilidade (Watson, 2000; Celeghini et al., 2017). De acordo com Sharafi et al. (2022) os avanços das pesquisas na criopreservação do sêmen, associado aos programas de melhoramento, buscam mitigar os danos induzidos pela criopreservação, sendo estes oxidativos, osmóticos e epigenéticos. É sabido que durante a congelação e descongelação das células espermáticas, ocorre elevação na produção de ROS, que influencia a atividade das enzimas antioxidantes. Assim, o aumento nas concentrações de ROS leva ao desequilíbrio junto aos níveis de antioxidantes, prejudicando a fisiologia e a viabilidade espermática (Apriokur, 2013).

Além das alterações ocasionadas durante o processamento, ressalta-se as particularidades entre espécies e indivíduos, como tamanho das células, concentração de lipídeos e proteínas presentes nos espermatozoides, que fazem com que não exista uma metodologia padrão de congelação espermática para todas as espécies (Lv et al., 2019). Como exemplo de particularidades entre espécies, pode-se citar a espécie caprina, onde o plasma seminal apresenta em sua constituição a enzima fosfolipase A, que influencia negativamente na criotolerância dos espermatozoides (Coloma et al., 2010).

Diante das limitações supracitadas e já conhecidas, faz-se necessário a associação desta biotécnica a outras ferramentas, ou até mesmo melhoramento no protocolo e na formulação de diluentes, com base na utilização de aditivos. Por exemplo, a adição de antioxidantes aos diluentes de criopreservação de sêmen, a fim de minimizar o estresse oxidativo (Souza et al., 2019).

Contudo, a suplementação de diluidores de criopreservação vem sendo objeto de pesquisa em diferentes espécies, buscando reduzir os danos ocasionados às membranas plasmática e acrossomal, e, conseqüentemente, a peroxidação lipídica resultantes do processo de criopreservação (Amidi et al., 2016).

Estudo realizado buscando avaliar a influência da Miricetina na viabilidade espermática de sêmen ovino após descongelação, demonstraram melhora nos parâmetros cinéticos dos grupos suplementados com Miricetina na concentração de 10 e 100nM, ressaltando a preservação das estruturas espermáticas (Arruda et al., 2018).

Em contrapartida, Monteiro et al. (2022), objetivando investigar o efeito da melatonina sobre a qualidade espermática de caprinos, não observaram melhoria em nenhuma das concentrações utilizadas aos diluidores de leite desnatado e gema de ovo, ressaltando que a concentração de 4 mM de melatonina foi prejudicial, possivelmente em decorrência do aumento da concentração de ROS intracelular. Porém na

espécie bovina (Ashraffi et al., 2013) e ovina (Succu et al., 2011) a suplementação com melatonina mostrou-se benéfica aos espermatozoides, pós-descongelamento.

O antioxidante Trolox foi utilizado acrescido aos diluidores de congelamento de sêmen caprino e ovino, leite desnatado e tris gema de ovo, respectivamente. Porém, nas concentrações de 20 ou 40 μM de Trolox, não se observou benefícios à preservação das células espermáticas (Arruda et al., 2021), apesar de ser um antioxidante que protege a célula contra peroxidação lipídica na espécie ovina (Silva et al., 2013).

Em busca de um avanço mais expressivo, estudos vem associando a criopreservação de sêmen a nanotecnologia, ferramenta de grande potencial que já vem sendo explorada frente às suas vantagens, a fim de mitigar os danos celulares, melhorando os resultados da criopreservação e a sua associação a outras técnicas como a inseminação artificial.

Nanotecnologia

Avanços na biologia da reprodução permitiram o surgimento de estratégias inovadoras a serem desenvolvidas usando a biologia molecular para manipular espermatozoides. De acordo com Dario (2016), a nanotecnologia é o termo que se dá a técnicas, instrumentos e materiais que operam em escalas nanométricas. Esta técnica se apresenta em rápida expansão, visando à produção de nanomateriais com propriedades físico-químicas particulares (Lan e Yang, 2012).

A nanotecnologia combina biologia, física, química, química de materiais e engenharia, com objetivo de produzir partículas menores que 100 nm de diâmetro, conhecidas como nanopartículas ou nanomateriais (Falchi et al., 2018). Por ser uma tecnologia impactante do século 21, essa tecnologia pode beneficiar a indústria da produção animal, especialmente por meio da manipulação do sêmen, pós-colheita, para posterior uso na inseminação artificial (IA), que pode revolucionar essa indústria em todo o mundo (Feugang et al., 2015).

Descrita como uma tecnologia promissora, de grande impacto no século XXI (Feugang et al., 2019), que permite manipular, controlar e produzir sistemas nanoestruturados (Bayda et al., 2019), sua utilização tem avanço contínuo, dado seu potencial e ampla aplicabilidade nas diferentes áreas (Chavez-Hernandez et al., 2024), em virtude das vantagens apresentadas pelos sistemas nanoestruturados, como melhor biodisponibilidade, maior mobilidade e capacidade de absorção celular, entre outras (Osama et al., 2020).

Assim, diversas pesquisas vêm sendo conduzidas associando sistemas nanoestruturados às técnicas reprodutivas. Especificamente na reprodução de machos, estudos objetivam desenvolver sistemas em escalas nanométricas buscando o controle e melhoria da fertilidade nas diferentes espécies, do processo de criopreservação de gametas e da produção de sistemas de liberação controlada de moléculas, como antioxidantes, vitaminas, antibióticos, entre outros (Iftikhar et al., 2021).

Nanopartículas

Entre os sistemas, ressalta-se as nanopartículas, descritas como partículas sintetizadas em tamanhos nanométricos, a partir de materiais como proteínas e metais, entre outros, na qual sua utilização vem se destacando devido às propriedades físicas e químicas apresentadas, que influenciam diretamente sua estabilidade, solubilidade e funcionalidade (Falchi et al., 2018).

Diante do potencial já apresentado nos diferentes estudos, as nanopartículas vêm influenciando de forma positiva a fertilidade dos machos, como, por exemplo, quando utilizadas conjugadas a enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, assim como gonadotrofinas, visando a redução do impacto ocasionado pelo estresse oxidativo, assim como a estimulação da espermatogênese, respectivamente (Feugang et al., 2019).

Nanopartículas carregadas com superóxido dismutase foram utilizadas a fim de avaliar a influência das mesmas sobre as células de Sertoli e o estresse oxidativo, onde demonstraram que sua utilização favoreceu maior absorção por estas células, assim como promoveu diminuição do estresse oxidativo (Snow-Lisy et al., 2013).

Buscando minimizar os danos celulares ocasionados especificamente pelo estresse oxidativo, visto que ainda constitui fator limitante à criopreservação do sêmen, Mousavi et al. (2019) compararam os efeitos da suplementação de diluente à base de nano lecitina com antioxidantes como vitamina E (0,1, 0,2, 0,4, 0,6 e 1,0 mM) e glutatona peroxidase (0,5, 1, 2 e 3 mM). Os resultados demonstraram que a suplementação do diluidor à base de nano lecitina com glutatona peroxidase na concentração de 1.0 mM resultou em maior integridade e funcionalidade de membrana plasmática e menor índice de peroxidação lipídica, determinada a partir das concentrações de malondialdeído (MDA). Diante dos resultados, os autores ressaltaram que a

utilização de antioxidantes acrescidos a um diluente à base de nano lecitina torna-se viável, quando associada à criopreservação do sêmen de touro.

Nano lecitina também foi utilizada como aditivo ao diluidor base de criopreservação de sêmen caprino buscando avaliar seus efeitos sobre a criosobrevivência de espermatozoides, sendo comparado aos diluidores à base de lecitina e de gema de ovo. Com base nos resultados obtidos, os autores concluíram que o diluidor constituído por nano lecitina à 2% mostrou-se eficaz, uma vez que reduziu a ocorrência e apoptose e aumentou a motilidade, funcionalidade da membrana e viabilidade espermática, resultando em melhor sobrevivência dos espermatozoides, pós-criopreservação (Nadri et al., 2019).

Nanopartículas de óxido de zinco foram utilizadas nas concentrações de 25, 75 e 150 µg/mL acrescidas ao diluente de congelamento Tris gema de ovo, não alterou os parâmetros cinéticos e as membranas das células espermáticas de ovinos, após descongelamento, porém aumentou o potencial de membrana mitocondrial destas células (Arruda et al., 2021). Esta elevação no potencial foi relacionada à influência do zinco, uma vez que sua funcionalidade está associada ao ATP, agindo sobre a redução e regulação de energia fosfolipídica, na qual exerce um impacto direto no potencial de membrana mitocondrial (Lewis-Jones et al., 1996).

Em contrapartida, em sêmen da espécie caprina, a adição de nanopartículas de óxido de zinco ao diluidor de congelamento Tris gema de ovo melhorou a motilidade total das células espermáticas após descongelamento, apesar de ter influenciado negativamente os parâmetros de cinética espermática (VSL, VAP, LIN, STR e WOB), reduzindo o potencial fertilizante dos espermatozoides, uma vez que estes parâmetros estão diretamente relacionados a este potencial (Arruda et al., 2024).

Khalil et al. (2019) utilizaram nanopartículas de selênio como suplementação de diluente de congelamento de sêmen de touros holandeses, buscando avaliar a influência das mesmas sobre as características espermáticas, pós-descongelamento. Os autores observaram que a adição destas nanopartículas na concentração de 1.0 µg/mL ao diluente melhorou a qualidade espermática, pós-descongelamento, o que resultou, conseqüentemente, em maior taxa de fertilidade *in vivo*. Estes autores relacionaram as melhorias ao aumento na capacidade do plasma seminal em minimizar o estresse oxidativo. Além disso, ressaltaram que a atividade antioxidante e a relação dependente da glutatona peroxidase com o selênio previnem as estruturas celulares dos danos ocasionados pelos oxidantes, evidenciando a atividade antioxidante da glutatona peroxidase para os lipídios de membrana celular.

Em contrapartida, nanopartículas metálicas como de ouro foram utilizadas em células espermáticas de touro, visando avaliar sua influência sobre a viabilidade dos espermatozoides incubados à 37 °C por 2 h. Os resultados não comprovaram a internalização das nanopartículas. No entanto, a viabilidade espermática foi influenciada quando se utilizou a concentração de 10 mg/mL das nanopartículas, diminuindo significativamente a motilidade e prejudicando a capacidade de fertilização dos espermatozoides. Os autores relacionaram esta diminuição aos possíveis aglomerados de partículas aderidos à membrana celular (Taylor et al., 2013).

Um outro segmento da reprodução animal que vem sendo utilizado junto aos sistemas nanoestruturados é a sexagem de espermatozoides. Diante das vantagens apresentadas ao utilizar sêmen sexado, estudos vêm avançando a fim de minimizar os danos ocasionados às células espermáticas, a partir da técnica de citometria de fluxo já utilizada (Rath et al., 2013). Atualmente este método é o de eleição, por permitir a produção de doses de sêmen em escala comercial, apesar de ainda apresentar alto custo e número reduzido de células viáveis pós-sexagem (Quelhas et al., 2021), conforme resultados de estudos que utilizaram sêmen sexado em programas de inseminação artificial em éguas (Panarace et al., 2013) e suínos (Rath et al., 2013).

Em sêmen de touro, a associação do sêmen sexado por citometria de fluxo à criopreservação demonstrou que as células espermáticas sexadas apresentaram alterações de membrana, resultando na antecipação da reação acrossomal, após descongelamento, e diminuição na sobrevivência destas células (Mocé et al., 2006). A fim de minimizar estes resultados e potencializar esta biotécnica reprodutiva, Dominguez et al. (2018) utilizaram nanopartículas magnéticas para selecionar espermatozoides de jumentos portadores do cromossomo X, com base no potencial zeta, uma vez que, a carga dos espermatozoides carregado de cromossomo X é -20 mV e de cromossomo Y é -16 mV. Os resultados demonstraram que a utilização de nanopartículas magnéticas para sexagem de espermatozoides é tão eficaz quanto a citometria de fluxo. No entanto, a técnica usando as nanopartículas torna-se mais viável pela celeridade e facilidade na execução, ressaltando o menor custo quando comparado à citometria de fluxo.

Estudo utilizando sêmen de garanhões, sexado com nanopartículas magnéticas, utilizado na inseminação artificial em éguas com espermatozoides carregados com cromossomo X, demonstrou a eficácia da técnica na separação espermática, ressaltando que a mesma não influenciou negativamente a viabilidade espermática, quando comparado ao controle (Castex e Losinno, 2018). Na espécie bovina,

nanopartículas de ouro conjugada com oligonucleotídeo foram eficazes para sexagem de sêmen, uma vez que o nucleotídeo utilizado se ligou especificamente a regiões presentes em espermatozoides portadores de cromossomo Y (Gamrad et al., 2016).

Nanoemulsão

Outro sistema nanotecnológico que vem sendo evidenciado na reprodução animal são as nanoemulsões. Estas são descritas como emulsões constituídas por dois líquidos imiscíveis, normalmente óleo e água, estabilizados por um surfactante, onde suas partículas apresentam-se em tamanhos nanométricos, variando de 20 a 1000 nm (Jaiswal et al., 2015). A escolha para utilização das nanoemulsões dar-se também por meio das vantagens apresentadas por este sistema, como maior biodisponibilidade, tamanho das partículas, capacidade de penetração e absorção (Trados et al., 2004).

Sánchez-Rubio et al. (2020) avaliaram a viabilidade de espermatozoides descongelados e incubados com nanoemulsão de vitamina E (6 mM e 12 mM), avaliadas no intervalo de 2 e 4 h, pós incubação. Os resultados demonstraram valores superiores no grupo tratado quando comparado ao grupo Trolox (controle), melhorando os parâmetros de motilidade total e progressiva, além de prevenir danos oxidativos às células espermáticas. Especificamente na concentração de 12 mM pode-se observar melhores parâmetros de cinética espermática e integridade de acrossoma, e diminuição na produção de ROS.

Buscando reduzir os danos ocasionados pelo estresse oxidativo aos espermatozoides, Jurado-Campos et al. (2021) utilizaram vitamina E acrescida a nanoemulsões e hidrogéis, com o objetivo de avaliar a influência dos mesmos na viabilidade dos espermatozoides de veados, pós-congelação, avaliados após 2, 5 e 24 h de incubação a 37 °C. Os resultados evidenciaram que a utilização da vitamina E na forma de nanoemulsão e hidrogéis torna-se vantajosa, uma vez que promoveu melhoria na motilidade espermática, assim como redução na produção de ROS e na peroxidação lipídica, sob condições de estresse oxidativo (vitamina E livre).

Nanoemulsões de óleos essenciais de oliva, linhaça e semente de uva foram utilizadas a fim de avaliar a influência das mesmas na qualidade de sêmen de búfalos, pós-criopreservação. Foi observado que a nanoemulsão de óleo de semente de uva a 3,5% melhora significativamente a integridade de membrana e motilidade progressiva, assim como reduziu as concentrações de MDA, óxido nítrico e caspase 3, resultando em maior taxa de prenhez. Os autores concluíram que a nanoemulsão de óleo de semente de uva pode ser utilizada como estratégia para melhorar a funcionalidade espermática e o potencial fertilizante, minimizando os danos ocasionados pelo estresse oxidativo resultante do processo de criopreservação (Khalil et al., 2023).

Por via oral, nanoemulsões de curcumina e curcumina na forma molecular foram acrescidas à dieta proteica de ratos, visando avaliar a eficácia das mesmas sobre as alterações testiculares induzidas por uma dieta pobre em proteína, repercutindo na espermatogênese e no desempenho reprodutivos destes ratos. Para ambos os tratamentos, foi possível observar resultados favoráveis relacionados ao desempenho reprodutivo e espermatogênese. No entanto, a curcumina utilizada em escala manométrica mostrou-se superior, sendo associado estes melhores resultados à maior biodisponibilidade, devido ao tamanho das partículas, potencial de solubilização e lipofilicidade (Ahmed-Farid et al., 2017).

Considerações

Após décadas de estudos, ainda é possível observar que a biotecnologia do sêmen continua sendo uma importante ferramenta para melhorar geneticamente os rebanhos, independente da espécie, apesar de ainda evidenciar a necessidade de aprimoramento dos processos de criopreservação e sexagem espermáticas, visando reduzir os danos ocasionados pelo estresse térmico, osmótico e oxidativo, e, consequentemente, aumentar as taxas de prenhez, pós-inseminação.

Pesquisas que visam reduzir o estresse oxidativo e melhorar os parâmetros espermáticos, pós-congelação e sexagem, testaram diversas substâncias antioxidantes adicionadas ao diluidor. No entanto, em virtude das particularidades de composição e funcionalidade das diferentes estruturas celulares, associadas às diversas características relacionadas às espécies, ainda não foi possível estabelecer uma substância capaz de minimizar totalmente os efeitos deletérios ocasionados pelo uso destas tecnologias.

Na atualidade, a nanotecnologia utilizada tanto na forma de nanopartículas quanto de nanoemulsão se apresenta bastante promissora em promover melhoria na taxa de fertilidade dos espermatozoides, em virtude de proporcionar maior biodisponibilidade, potencial de solubilização e lipofilicidade de substâncias conhecidas pelo potencial de minimizar os efeitos deletérios dos diversos processos utilizados na biotecnologia do sêmen.

Referências

- Ahmed-Farid OAH, Nasr M, Ahmed RF, Bakeer RM.** Beneficial effects of curcumin nano-emulsion on spermatogenesis and reproductive performance in male rats under protein deficient diet model: enhancement of sperm motility, conservancy of testicular tissue integrity, cell energy and seminal plasma amino acids content. *J Biomed Sci*, v.2, p.66, 2017.
- Aitken RJ, Ilulius GN, Finnie JM, Hedges A, McLachlan, RI.** Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Hum Reprod*, v.10, p.2415-2426, 2010.
- Amidi F, Pazhohan A, Shabani NM, Khodarahmian M, Nekoonam S.** The role of antioxidants in sperm freezing: A review. *Cell Tissue Bank*, v.17, p.745-756, 2016.
- Apriokur JS.** Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. *J Reprod Infert*, v.14, p.158-172, 2013.
- Arruda LCP, Araujo-Silva RAJ, Monteiro MM, Silva RPF, Oliveira AS, Mergulhão FCC, Monteiro Junior PLJ, Batista AM, Guerra MMP.** Avaliação in vitro do sêmen congelado de carneiros com diluidor suplementado com miricetina. *Arq Bras Med Vet Zoot*, v.70, n.1, p.153-159, 2018.
- Arruda LCP, Oliveira GAP, Carneiro GF, Guerra MMP.** The kinetics of goat sperm is negatively affected after freezing in an extender including zinc oxide nanoparticles. *Cryo Letters*, v.45, p.100 – 105, 2024.
- Arruda LCP, Silva GRD, Batista AM, Silva ECB, Souza, HM, Couto GIS, Silva TMS, Guerra MMP.** Effect of trolox added to freezing extenders over goat and ram spermatozoa. *Res Soc Dev*, v.10, n.5, 2021.
- Arruda LCP, Tobal LFM, Carneiro, GF, Guerra MMP.** Zinc oxide nanoparticles alter the membrane potential of mitochondria from post-thawed ram spermatozoa. *Small Rum Res*, v.202, p.106466, 2021.
- Ashrafi I, Kohram H, Ardabili FF.** Effect of Melatonin on kinects, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.139, p.25-30, 2013.
- Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F.** The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules*, v.25, p.1-15, 2019.
- Castex HR, Losinno L.** Nanopartículas magnéticas para separación de espermatozoides x en semen equino. Resultados de campo y comerciales. *Med Vet Zoot*, v.13, n.2, p.268-275, 2018.
- Celeghini ECC, Arruda R, Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF, Rodrigues PHM.** Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Anim Reprod Scie*, v.104, p.119-131, 2008.
- Celeghini ECC, Arruda RPDE, Florez-Rodriguez SA, Santos FB, Alves MBR, Oliveira BMM.** Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.41, n.1, p.40-45, 2017.
- Chavez-Hernandez JA, Valerde-Salcedo AJ, Navarro-Tovar G, Gonzalez C.** Safe nanomaterials: from their use, application, and disposal to regulations. *Nanoscale Adv*, v.6, p.1583, 2024.
- Coloma MA, Toledano-Díaz A, López-Sebastián A, Santiago-Moreno J.** The influence of washing Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) sperm on the effects of cryopreservation in dependency of the photoperiod. *Theriogenology*, v.73, p.900-908, 2010.
- Comhaire FH, Mahmoud AMA, Depuydt CE, Zalata AA, Christophe AB.** Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. *Hum Reprod Update*, v.5, p.393–398, 1999.
- Dario MF.** *Desenvolvimento e avaliação de eficácia de nanoemulsão catiônica bioativa na produção capilar aos danos foto-oxidativos*, 2016. 187p. Tese (Doutorado em produção e controle farmacêutico) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
- Domínguez E, Moreno-Irusta A, Castex HR, Bragulat AF, Ugaz C, Clemente H, Giojalas L, Losinno L.** Sperm sexing mediated by magnetic nanoparticles in donkeys, a preliminary in vitro study. *J Equine Vet Sci*, v.65, p.123-127, 2018.
- Falchi L, Khalil WA, Hassan M, Marei WFA.** Perspectives of nanotechnology in male fertility and sperm funcion. *Int J Vet Sci Med*, v. 6, p. 265-269, 2018.
- Feugang JM, Liao SF, Crenshaw MA, Clemente H, Willard STE, Peter R.** Lectin-functionalized magnetic iron oxide nanoparticles for reproductive improvement. *J Fert*, v.3, p.17–19, 2015.
- Feugang JM, Rhoads CE, Mustapha PA, Tardif S, Parrish JJ, Willard ST, Ryan P.L.** Treatment of boar sperm with nanoparticles for improved fertility. *Theriogenology*, v.137, p.75-81, 2019.
- Gamrad L, Mancini R, Werner D, Tiedmann D, Taylor U, Ziefu A, Rehbock C, Klein S, Kues W, Barcikowski S, Rath D.** Triplex-hybridizing bioconjugated gold nanoparticles for specific Y-chromosome sequence targeting of bull spermatozoa. *Analyst*, v.142, p.2020-2028, 2017.

- Gupta A, Eral HB, Hatton TA, Doyle PS.** Nanoemulsions: formation, properties, and applications. *Soft Matter*, v.12, p.2826-2841, 2016.
- Guthrie HD, Welch GR.** Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology*, v.78, n.8, p.1700-1708, 2012.
- Hu J, Sheng Y, Shi J, Yu B, Liao G.** Long circulating polymeric nanoparticles for gene/drug delivery. *Curr Drug Metab*, v.19, n.9, p.723-738, 2018.
- Iftikhar M, Noureen A, Uzair M, Jabeen F, Daim MA, Cappello T.** Perspectives of Nanoparticles in Male Infertility: Evidence for Induced Abnormalities in Sperm Production. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, v.18, p.1758, 2021.
- Jaiswal M, Dudhe R, Sharma PK.** Nanoemulsion: An advanced mode of drug delivery system. *3 Biotech*, v. 5, p. 123–127, 2015.
- Jurado-Campos A, Soria-Meneses PJ, Arenas-Moreira M, Alonso-Moreno C, Rodríguez-Robledo V, Soler AJ, Garde JJ, Del Rocío Fernández-Santos M.** Minimizing sperm oxidative stress using nanotechnology for breeding programs in rams. *J Anim Sci Biotechnol*, v.14, p.106, 2023.
- Jurado-Campos A, Soria-Meneses PJ, Sánchez-Rubio F, Niza E, Bravo I, Alonso-Moreno C, Arenas-Moreira M, García-Álvarez O, Soler AJ, Garde JJ, Fernández-Santos MDR.** Vitamin E Delivery Systems Increase Resistance to Oxidative Stress in Red Deer Sperm Cells: Hydrogel and Nanoemulsion Carriers. *Antioxidants*, v. 10, p.1780, 2021.
- Kumar A, Prasad JK, Srivastava N, Ghosh SK.** Strategies to Minimize Various Stress-Related Freeze-Thaw Damages During Conventional Cryopreservation of Mammalian Spermatozoa. *Biopreserv Biobank*, v.17, p.603-612, 2019.
- Khalil WA, El-Harairy MA, Zeidan AEB, Hassan MAE.** Impact of selenium nano-particles in semen extender on bull sperm quality after cryopreservation. *Theriogenology*, v.126, p.121-127, 2019.
- Khalil WA, Hassan MAE, Attia KAA, El-Metwaly HÁ, El-Harairy MA, Sakr AM, Abdelnour AS.** Effect of olive, flaxseed, and grape seed nano-emulsion essential oils on semen buffalo freezability. *Theriogenology*, v. 212, p. 9-18, 2023.
- Lan Z, Yang WX.** Nanoparticles and spermatogenesis: how do nanoparticles affect spermatogenesis and penetrate the blood–testis barrier. *Nanomedicine*, v.7, n.4, p.579–596, 2012.
- Lewis-Jones DI, Aird IA, Biljan MM, Kingsland CR.** Effects of sperm activity on zinc and fructose concentrations in seminal plasma. *Hum Reprod*, v.11, p.2465–2467, 1996.
- Lv C, Wu G, Hong Q, Quan G.** Spermatozoa Cryopreservation: State of Art and Future in Small Ruminants. *Biopreserv Biobank*, v.17, n.2, 2019.
- Majzoub A, Agarwal A.** Antioxidants in sperm cryopreservation. In *Male Infertility*; Berlin/Heidelberg: Springer, p. 671–678, 2020.
- Monteiro MM, Araujo-Silva RAJ, Arruda LCP, Oliveira AS, Mergulhão FCC, Monteiro Junior PL, Seal DCM, Trevisan M, Batista AM, Guerra MM.** Effect of melatonin in different extenders on the quality of frozen semen of goats. *Emerg Anim Spec*, v.5, p.100015, 2022.
- Mocé E, Graham JK, Schenk JL.** Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrossome reaction. *Theriogenology*, v.66, p.929-936, 2006.
- Mousavi SM, Towhidi A, Zhandi M, Amoabediny G, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Sharafi M, Hussaini SMH.** Comparison of two different antioxidants in a nano lecithin-based extender for bull sperm cryopreservation. *Anim Reprod Sci*, v. 209, p.106171, 2019.
- Nadri T, Towhidi A, Zeinoaldini S, Martínez-Pastor F, Mousavi M, Noei R, Tar M, Mohammadi Sangcheshmeh A.** Lecithin nanoparticles enhance the cryosurvival of caprine sperm. *Theriogenology*, v.133, p.38-44, 2019.
- Nascimento PS, Chaves MS, Santos Filho AS, Guido SI, Guerra MMP, Bartolomeu CC.** Produção In Vitro de Embriões Utilizando-se Sêmen Sexado de Touros 5/8 Girolando. *Ciênc Anim Bras*, v.16, n.3, p.358-368, 2015.
- Osama E, El-Sheikh SMA, Khairy MH, Galal AAA.** Nanoparticles and their potential applications in veterinary medicine. *J Adv Vet Res*, v.10, p. 268–273, 2020.
- Panarace M, Pellegrini RO, Basualdo MO, Belé M, Ursino DA, Cisterna R, Desimone G, Rodríguez E, Medina MJ.** First field results on the use of stallion sex-sorted semen in a large scale embryo transfer program. *Theriogenology*, v.81, p.520-525, 2013.
- Quelhas J, Santiago J, Matos B, Rocha A, Lopes G, Fardilha M.** Bovine semen sexing: Sperm membrane proteomics as candidates for immunological selection of X- and Y chromosome bearing sperm. *Vet Med Sci*, v.7, p.1633– 1641, 2021.
- Rath D, Barcikowski S, Graaf S, Garrels W, Grossfeld R, Klein S, Knabe W, Knorr C, Kues W, Meyer H, Michl J, Moench-Tegeger G, Rehbock C, Taylor U, Washausen S.** Sex selection of sperm in

- farm animals: Status report and developmental prospects. *Reproduction*, v.145, R15-30, 2013.
- Salamon S, Maxwell WMC.** Storage of Ram Semen. *Ani Reprod Sci*, v.62, p.77-111, 2000.
- Sánchez-Rubio F, Soria-Meneses PJ, Jurado-Campos A, Bartolomé-García J, Gómez-Rubio V, Soler AJ, Arroyo-Jimenez MM, Santander-Ortega MJ, Plaza-Oliver M, Lozano MV, Garde JJ, Fernández-Santos MR.** Nanotechnology in reproduction: Vitamin E nanoemulsions for reducing oxidative stress in sperm cells. *Free Rad Biol Med*, v.160, p.47-56, 2020.
- Santos MAM, Gradela A, Moraes EA, Souza WL, Alves NG, Costa JMC, Matos WCG.** Características do sêmen a fresco e descongelado de garanhões da raça Nordestina. *Pesq Vet Bras*, v.35, n.11, p.925-932, 2015.
- Sharafi M, Borghei-Rad SM, Hezavehei M, Shahverdi A, Benson JD.** Cryopreservation of Semen in Domestic Animals: A Review of Current Challenges, Applications, and Prospective Strategies. *Animals*, v.12, p.3271, 2022.
- Silva SV, Soares AT, Batista AM, Almeida FC, Nunes JF, Peixoto CA, Guerra MMP** Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk extender preserves ram spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation. *Anim Reprod Sci*, v.137, p.37-44, 2013.
- Snow-Lisy DC, Sabanegh ESJR, Samplaski MK, Morris VB, Labhasetwar, V.** Superoxide dismutase-loaded biodegradable nanoparticles targeted with a follicle-stimulating hormone peptide protect Sertoli cells from oxidative stress. *Fert Steril*, v.101, p.560-567, 2017.
- Souza WL, Moraes EA, Toniolli R.** Adição de antioxidantes ao sêmen de carneiros e seus efeitos após a descongelamento. *Pesq Vet Bras*, v.37, p.471-478, 2017.
- Stornelli MC, Tittarelli CM, Savignone CA, Stornelli MA.** Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Anal Vet*, v.25, n.2, p.28-35, 2005.
- Succu S, Berlinguer F, Pasciu V, Satta V, Leoni GG, Naitana S.** Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner, *J Pineal Res*, v.50, n.3, p.310–318, 2011.
- Taylor U, Barchanski A, Petersen S, Kues WA, Baulain U, Gamrad L, Sajti L, Barcikowski S, Rath D.** Gold nanoparticles interfere with sperm functionality by membrane adsorption without penetration, *Nanotoxicology*, v.8, p.118-127, 2014.
- Tadros T, Izquierdo P, Esquena J, Solans C.** Formation and stability of nano-emulsions. *Adv colloid interface Sci*, v.108-109, p.303-318, 2004.
- Ustuner B, Alcay S, Toker MB, Nur Z, Gokce E, Sonat Fa, Gul Z, Duman M, Ceniz C, Uslu A, Sagirkaya H, Soyly Mk.** Effect of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) seminal plasma on the post-thaw quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin- based or egg yolk based extender. *Anim Reprod Sci*, v.164, p.97-104, 2015.
- Vallet-Regi M, Colilla M, Izquierdo-Barba M, Manzano M.** Mesoporous sílica nanoparticles for drug delivery: current insights. *Molecules*, v.23, p.47-65, 2018.
- Watson PF.** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, v.60, p.481-492, 2000.
- Yanez-Ortiz I, Catalan J, Rodrigues Gil JE.** Advances in sperm cryopreservation in farm animal: Cattle, Horse, pig and sheep. *Anim Reprod Sci*, v.246, p.106904, 2022.
-