

## Princípios e etapas para o desenvolvimento de um diluidor de sêmen comercial

*Principles and steps for development a commercial semen extender*

Sildivane Valcácia Silva<sup>1,3\*</sup>, Camilla Flávia Avelino de Farias<sup>2</sup>, Matheus Soares da Silva Melo<sup>3</sup>,  
Alex Souza Rique<sup>3</sup>, Arianne Raquel de Menezes Moraes<sup>1</sup>, Kássia Cristina de Barros<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biotecnologia, UFPB, João Pessoa, PB, Brasil;

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO), UFPB, João Pessoa, PB, Brasil, <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCAn), UFPB, Areia, PB, Brasil

### Resumo

O sêmen é uma suspensão composta por plasma seminal e espermatozoides, os quais apresentam tempo de sobrevivência limitado pós-ejaculação. Com o intuito de aumentar a longevidade deste material biológico, a biotecnologia oportuniza a produção de diluidores para maximizar o uso de um ejaculado em várias fêmeas diferentes, seja imediatamente após colheita e diluição ou dias e até mesmo anos após sua colheita, desde que submetidos à criopreservação. Para este feito, os princípios da elaboração de um diluidor devem ser embasados no entendimento da fisiologia espermática e de como minimizar os efeitos deletérios da variação de temperatura sobre a integridade e função do espermatozoide. Entendido os princípios, as etapas compreendem a sucessão de combinações entre os componentes do diluidor e os testes para determinar a capacidade de proteção à célula e a manutenção da função do espermatozoide após o processo de criopreservação. Assim, esta revisão pretende fundamentar os princípios básicos na elaboração de um diluidor e como este produto pode ter competitividade no mercado.

**Palavras-chave:** biotecnologia, criopreservação, diluente seminal.

### Abstract

*Semen is a suspension composed of seminal plasma and sperm, which have a limited survival time post-ejaculation. In order to increase the longevity of this biological material, biotechnology provides the opportunity for the production of extenders to maximize the use of an ejaculate in several different females, either immediately after collection and dilution or days and even years after collection, as long as they are subjected to cryopreservation. To achieve this, the principles of creating an extender must be based on an understanding of sperm physiology and how to minimize the harmful effects of temperature variation on the integrity and function of sperm. Once the principles are understood, the steps include the succession of combinations between the components of the extender and tests to determine the capacity to protect the cell and the maintenance of sperm function after the cryopreservation process. Therefore, this review aims to substantiate the basic principles in the development of a diluent and how this product can be competitive in the market.*

**Keywords:** biotechnology, cryopreservation, seminal extender.

### Introdução

A criopreservação é uma biotécnica que permite a conservação de material biológico para uso posterior. Esta conservação pode ser em curto período de tempo, com o intuito de preservar as características do material durante o seu transporte até a sua utilização, ou por períodos prolongados, sem data determinada para a sua aplicação. Nesta condição, os meios de preservação devem ofertar condições de sobrevivência à célula ou tecido submetidos ao processo de criopreservação.

O espermatozoide é uma célula altamente especializada que, em contato com o plasma seminal, passa por mudanças estruturais e em condições de monta natural é depositado no trato reprodutor feminino sem a exposição à luz, elevada tensão de oxigênio, flutuações de temperatura ou qualquer outra manipulação promovida pelas biotécnicas, que expõem à célula a todas estas variações previamente listadas.

É sabido que o processo de refrigeração apenas reduz o metabolismo celular, porém ainda há

\*Correspondência: sildivane@cbiotec.ufpb.br

Recebido: 29 de abril de 2023

Aceito: 25 de maio de 2023

consumo energético e excreção celular; na congelação, a célula interrompe a sua atividade biológica, entretanto, no reaquecimento, há o restabelecimento das funções celulares e consequente reorganização dos componentes das membranas, influxo de fluidos e sinalização iônica para retorno à atividade celular.

Em complemento, deve-se considerar a variável espécie na preservação de sêmen animal. A composição da membrana plasmática, por exemplo, é diversificada entre as espécies de interesse comercial e não há uma formulação de diluidor que seja considerada universal para uso comercial.

Neste contexto, considerando as variações de temperatura, além do parâmetro fisiológico para o espermatozoide, é possível combinar componentes que ofertem à célula espermática os requerimentos necessários à sua sobrevivência por períodos prolongados?

Desta forma, o objetivo deste estudo é apresentar uma revisão que relacione as necessidades da célula espermática, durante os processos de diluição, refrigeração e congelação, com a elaboração de diluidores seminais para uso comercial.

### Composição de um diluidor seminal

Diluidores seminais são constituídos por água, tampões, substâncias não iônicas, açúcares, diferentes tipos de macromoléculas e antibióticos. Destes, o componente em maior quantidade é a água.

A água é considerada espermicida para mamíferos, uma vez que reduz a pressão osmótica gerada pelos componentes do plasma seminal e promove o rompimento da membrana plasmática, inviabilizando o espermatozoide para a fecundação (Maia, 2010). Entretanto, na elaboração de um diluidor, a água é o solvente para os demais componentes, os quais modificam a osmolaridade inicial da água, ajustando à osmolaridade do espermatozoide, que varia entre 280 e 350 mOsm, a depender da espécie.

Este ajuste é necessário, uma vez que, ao aumentar a osmolaridade pós-ejaculação, maior a proporção de espermatozoides em processo de capacitação (Lavanya *et al.*, 2021). Não menos importante, a água utilizada na feitura do diluidor deve ser livre de contaminantes, inicialmente deionizada, para remoção de eletrólitos que possam comprometer a interação do espermatozoide com o diluidor e posteriormente destilada, para remoção de microrganismos.

Ao observar os processos de diluição, refrigeração, congelação e descongelação de espermatozoides, é possível identificar que ocorrem alterações na estrutura e na função celular, que comprometem o objetivo final, que é a fertilização. É sabido que a redução da temperatura promove uma reorganização das membranas biológicas (Shi *et al.*, 2014), com a migração de componentes e agregação de outros, modificando a sinalização celular. Em espermatozoides de carneiros, por exemplo, a congelação e descongelação diminuem a atividade dos canais catiônicos (CatSper 3, p. ex.), que interfere na motilidade espermática (Güngör *et al.*, 2021). Desta forma, o diluidor deve ser elaborado com componentes que tentem minimizar os procedimentos não-fisiológicos ao qual o espermatozoide é submetido.

A diluição é o primeiro impacto que o espermatozoide sofre. No ambiente epididimário, o ácido siálico reduz o potencial hidrogeniônico (pH) na cauda do epidídimo e mantém o espermatozoide em baixa atividade flagelar. Ao ser ejaculado, o espermatozoide entra em contato com o plasma seminal, reativa o batimento flagelar, flui pelo trato reprodutor da fêmea, modificando o comportamento do batimento da cauda em relação ao (pH) onde está inserido. Por outro lado, a influência do plasma seminal pode promover a alcalinização do meio e iniciar o processo de capacitação espermática (Guasti; Monteiro; Papa, 2012). Desta forma, é perceptível que o pH ácido reduz a movimentação espermática e o pH alcalino hiperativa a célula (Mishra *et al.*, 2018).

Ao considerar a influência da variação do pH na atividade espermática, o diluidor deve conter elementos que evitem a estase ou a ativação precoce do espermatozoide. Os tampões têm a finalidade de equilibrar o pH do diluidor, uma vez que o metabolismo celular, componentes do diluidor e a interação com o dióxido de carbono do meio, pela exposição do sêmen ao ambiente, podem promover a acidificação do pH, que diminui o batimento flagelar (Cardoso *et al.*, 2010).

O Tris (hidroximetilamino metano) é o tampão mais comumente utilizado na preparação de diluidores, seguido de Hepes (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico), Tes [ácido N-tris (hidroximetil) metil-2-aminoetanosulfônico], PIPES [ácido piperazina-N,N'-bis(2-etanosulfônico)], e outros menos populares, provavelmente devido ao seu alto valor para aquisição, como BES [ácido N,N-Bis(2-18hidroxietil)-2-aminoetanosulfônico] e MES (ácido 4-morfolinoetanosulfônico) (Trentin, 2018).

Para ofertar energia para os espermatozoides, um diluidor deve conter açúcar. Todavia, os açúcares que compõem um diluidor podem ter funções diversificadas, uma vez que os espermatozoides não conseguem metabolizar açúcares complexos, degradando apenas glicose, frutose ou manose em ácido láctico, na condição anaeróbica. Por outro lado, o metabolismo energético é mais eficiente para a

movimentação flagelar na condição aeróbica.

Desta forma, para aporte energético, os espermatozoides utilizam monossacarídeos (Celeste; Lourdes, 2015). Dissacarídeos como a sacarose, lactose, rafinose e trealose podem ser utilizados na elaboração de diluidores para aumentar a hipertonicidade do meio e favorecer a desidratação celular, minimizando o armazenamento de água no interior do espermatozoide, com consequente redução de grandes cristais de gelo no espaço interno da célula espermática, sendo componentes indicados para a preparação de diluidores para a vitrificação espermática (Pérez-Márin *et al.*, 2018; Consuegra *et al.*, 2019).

Devido à organização da membrana plasmática para adequação às modificações impostas pela redução de temperatura, um componente fundamental do diluidor é o estabilizador de membrana, que atuará como um protetor. Na literatura é observada uma gama de referências que apontam a gema de ovo (Alcay *et al.*, 2015; Tarig *et al.*, 2017; Strzeżek; Reksa, 2022) e o leite desnatado (Soares *et al.*, 2015; Abe *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2020) como crioprotetores não penetrantes que protegem o espermatozoide durante o processo de congelação e descongelação.

Entretanto, em revisão realizada por Layek *et al.* (2016), alguns pontos foram levantados para fundamentar estudos em substituir estes componentes na elaboração de diluidores: 1) o risco de contaminação bacteriana ou xenobiótica e, como consequência, potencial de introdução de doenças exóticas através da distribuição de sêmen em nível comercial; 2) as endotoxinas produzidas por tais contaminantes reduzirem a potencial capacidade fertilizante dos espermatozoides; 3) a presença de vacúolos lipídicos e outras partículas nos diluentes de gema de ovo interferirem na avaliação microscópica e nos ensaios bioquímicos e metabólicos do sêmen diluído; 4) a composição diversificada e variável de partículas na gema do ovo dificultaria o controle de qualidade dos diluentes à base de gema; e 5) a gema de ovo e os diluentes à base de leite podem alterar a integridade estrutural e funcional do espermatozoide pós-congelação.

Para confirmar a modificação estrutural ao usar gema de ovo na composição do diluidor, Anzar, Rajapaksha e Boswall (2019), reportaram que as proteínas da gema do ovo se ligam firmemente à membrana plasmática do espermatozoide. Ramirez-Vasquez e colaboradores (2019), em estudo similar, apontaram que a ligação entre as proteínas presentes na gema do ovo interferiam na função espermática. Desta forma, a substituição destes componentes tem sido objeto de pesquisas no desenvolvimento de diluidores livres de produtos de origem animal.

Com este intuito, diluidores comerciais a base de fontes vegetais como a lecitina de soja e a água de coco foram desenvolvidos para atender a esta demanda. Os diluidores comerciais à base de lecitina de soja vêm sendo testados e os relatos na literatura divergem quanto à sua substituição eficiente em relação à gema de ovo (Layek *et al.*, 2016), e em decorrência disto, estudos têm sido desenvolvido para aprimorar o diluidor à base de lecitina de soja em diferentes espécies (Vidal *et al.*, 2013; Yildiz, Bozkurt, Yavas, 2013; Nishijima *et al.*, 2015; Najafi *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2019).

É importante registrar que o diluidor à base de água coco vem sendo constantemente avaliado em diferentes espécies (Rondon *et al.*, 2008; Almeida-Monteiro *et al.*, 2020; Brito *et al.*, 2021; Cabral *et al.*, 2023; Costa *et al.*, 2023) e foi desenvolvido por uma empresa brasileira de Biotecnologia, a ACP Biotecnologia, nascida em uma incubadora de uma universidade estadual nordestina, no Ceará. Os diluidores à base de água de coco apresentaram resultados compatíveis com a preservação celular, como integridade de membrana plasmática, preservação nuclear e capacidade fertilizante quando utilizados nos processos de diluição e refrigeração, entretanto, para a congelação, ainda carecem da adição de um protetor de membrana plasmática, comumente a gema de ovo.

Estes componentes atuam no meio externo à célula. Para permitir a congelação espermática, é necessário modificar a propriedade coligativa da água presente no meio e permitir a desidratação celular e minimizar a formação de grandes cristais de gelo. Desta forma, a adição de crioprotetores penetrantes (alcoólicos e amidas), é fundamental para o sucesso da criopreservação do espermatozoide. O crioprotetor alcoólico mais comumente utilizado é o glicerol, que funciona bem para os ruminantes de maneira geral, seguido de combinações com etilenoglicol e o dimetilsulfóxido. As amidas são utilizadas principalmente na criopreservação de sêmen equino e suíno, entretanto, em combinação com os alcoólicos, com o objetivo de diminuir a concentração destes na formulação final do diluidor.

De forma complementar e um tanto conflituosa, os antibióticos fazem parte dos componentes dos diluidores. Este componente é adicionado com o objetivo de minimizar o crescimento de microrganismos no meio, visto que é um ambiente muito rico nutricionalmente para o desenvolvimento bacteriano e fúngico. Em geral, a combinação de estreptomicina e penicilina, assim como a gentamicina, estão entre os antibióticos mais utilizados na composição de diluentes para sêmen de animais de produção (Santos; Silva, 2020). Entretanto, há relatos que a adição de antibióticos pode comprometer a viabilidade espermática.

Moutinho *et al.* (2011) testaram ceftiofur, sulfato de estreptomicina e sulfato de gentamicina e observaram que a gentamicina foi eficiente no controle do crescimento bacteriano durante 72 horas de observação, porém este mesmo grupo apresentou os piores índices de integridade e função dos espermatozoides suínos. Estes mesmos achados foram observados em sêmen de carneiros por Anel-Lopez *et al.* (2021), que ainda propuseram uma reflexão sobre a redução do uso de antibióticos na criopreservação espermática.

Desta forma, estudos para propor substitutos aos antibióticos na elaboração de diluidores seminais vêm sendo realizados.

Nasreen *et al.* (2020) testaram a adição de mel de abelha em substituição ao antibiótico na criopreservação de sêmen de búfalo e tiveram efeitos positivos no controle de microrganismos. Este princípio se acosta no conteúdo de bioativos presentes no mel que tem ação antibacteriana e antifúngica para aumentar a sua viabilidade.

Resultados semelhantes foram encontrados por Sharaf *et al.* (2022), ao adicionar bioativos do pão de abelha na criopreservação de sêmen de carneiro. Baseado neste fundamento, biomoléculas naturais têm sido testados para substituir a adição de antibióticos na feitura dos diluidores seminais. Duracka *et al.* (2019) testaram a adição de resveratrol, quercetina e curcumina ao diluidor de sêmen de coelho, com contaminação bacteriana e comparam aos antibióticos, e constataram que a presença da bactéria e do antibiótico aumentou o dano ao DNA espermático, diferentemente do observado com as biomoléculas, que preservaram melhor a célula durante o estudo.

### Elaboração de um diluidor comercial

O diluidor para sêmen, seja apenas para diluição, ou para uso mais complexo como a conservação em refrigeração ou congelamento, é uma combinação de componentes que tentam assegurar a preservação da célula, mantendo a capacidade fertilizante. Entretanto, esta combinação de componentes deve ser de baixo custo para permitir a sua preparação e conseqüente comercialização, uma vez que o valor final pode ser um fator limitante para a sua manutenção no mercado.

A primeira etapa que deve ser pensada na elaboração de um diluidor com perspectiva comercial é o de garantir a água purificada. Para este fim, a destilação e a eletrodialise são técnicas pouco utilizadas em razão de serem processos demorados e apresentarem fraca relação custo-benefício, respectivamente, enquanto filtração, osmose reversa, deionização, adsorção e oxidação ultravioleta são amplamente utilizados, normalmente em conjunto, por serem processos mais eficazes, eficientes e de mais fácil operação. Os métodos citados, se usados de forma isolada, não seriam efetivos para a purificação da água, uma vez que para atingir os padrões mínimos de qualidade previstos em normas como a ISO3696 e a CLSI GP40-A4-AMD, é necessária a combinação de duas ou mais destas técnicas, além de correto manuseio e manutenção dos equipamentos de purificação e análises sistemáticas da água reagente (Lorenzo *et al.*, 2018).

Caso seja utilizada a gema do ovo na preparação do diluidor, os ovos frescos ou recém-postos devem ser adquiridos de uma granja de ovopostura, com certificação de granja avícola de reprodução, conforme a orientação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2022). O ovo apresenta poros e com o passar dos dias de sua ovopostura, há troca de gases com o ambiente, aumenta o espaço entre as câmaras de ar e fragiliza a membrana perivitelínica, comprometendo os fosfolípidos presentes na gema do ovo, que são a base de proteção à membrana plasmática do espermatozoide (Monteiro, Nascimento, Amaral, 2019). Uma outra possibilidade é a utilização da gema de ovo em pó, que foi submetida inicialmente ao processo de pasteurização e posterior secagem por *spray*, que garante a segurança sanitária deste produto (Toniolli *et al.*, 2016). Ao pensar no processo de purificação, o uso de lipoproteínas de baixa densidade (Lima *et al.*, 2019), que é a parte da gema que confere a proteção espermática à criopreservação, é uma alternativa, entretanto, de alto custo, à substituição da gema na sua totalidade.

No caso do leite, este deve ser usado na apresentação em pó e desnatado, para facilitar a sua conservação, minimizar a lipoperoxidação e otimizar a visibilidade das células ao microscópio (minimização dos glóbulos de gordura), e por já ter passado pelos processos de esterilização e inativação de lactenina (Meirelles *et al.*, 1998).

Em relação aos produtos de origem animal, é perceptível que existem protocolos que podem assegurar a questão sanitária, entretanto, não podem modificar a interação que estes componentes têm com a membrana plasmática, com citado anteriormente.

Desta forma, as fontes vegetais, os meios quimicamente definidos e a nanobiotecnologia têm

contribuído para a elaboração de diluidores competitivos. Diluidores a base de babosa (*Aloe vera*) têm sido desenvolvidos e testados em várias espécies, ainda com resultados contraditórios (Souza *et al.*, 2016; Yong, Nguang, Kari, 2017; Boonkong *et al.*, 2019; Farias *et al.*, 2019). Embora a *Aloe vera* preserve a membrana plasmática, é necessário o ajuste da sua viscosidade para permitir melhor fluidez da célula espermática e ainda, qual seria a melhor concentração para formulação do diluidor.

Para melhor embasamento para a escolha de possíveis substitutos à gema de ovo ou qualquer outro componente de um diluidor, a bioinformática pode ser utilizada para prospectar, *in silico*, quais moléculas poderiam melhor interagir com a membrana plasmática. A bioinformática é uma ciência/ferramenta que utiliza algoritmos e programas computacionais para estudar e entender informações e processos biológicos. Bustamante-Filho *et al.* (2019) realizaram uma revisão sobre proteômica em sêmen suíno e destacaram como a bioinformática pode auxiliar no entendimento das interações entre proteínas do plasma seminal, do espermatozoide e indicar possíveis marcadores para a andrologia.

Como uma ciência em vias de expansão, Gross e Mcloed (2017) chamam a atenção para os sistemas de validação que envolvem o uso desta ferramenta para a prospecção de interações entre moléculas. Entretanto, uma vez identificados os componentes de um extrato vegetal, por exemplo, a bioinformática poderia realizar estudos prospectivos sobre as moléculas presentes no extrato e a possível interação com a membrana. Melo *et al.* (2024) fizeram um extrato etanólico de Capim Santo (*Cymbopogon citratus*) e identificaram a presença de flavonoides, taninos e fitoesteróis, que tem função antioxidante, antimicrobiana e protetora de membrana, respectivamente.

De acordo com a estrutura química do fitoesterol, a sua composição é similar ao colesterol, diferenciando-se deste pelas configurações no núcleo ou na cadeia lateral, ou ainda, pelos seus grupos polares (Breda, 2010). A bioinformática contribuiria no estudo da interação do fitoesterol encontrado no extrato com a membrana plasmática, se promoveria uma relação estável ou fortemente estável. No caso da segunda opção, a interação seria negativa, pois não haveria a desestabilização da membrana para os fenômenos de capacitação e reação acrossomal, ou seja, embora o espermatozoide esteja íntegro, encontra-se afuncional.

Com a introdução da bioinformática na elaboração de diluidores, muitos experimentos *in vitro* seriam minimizados e as interações com maior perspectiva de ação poderiam ser estudadas *in vitro*, com posterior uso *in vivo*.

Ao fim de toda elaboração de um diluidor com fins comerciais, a sua real capacidade de se estabelecer como um produto no mercado é o seu sucesso na fertilização *in vivo*, ou seja, é aquele que consegue conservar a estrutura e a função espermática pós-criopreservação e garantir a prenhez, sem riscos de infecção uterina ou má formação do feto.

### Considerações Finais

Existem vários diluidores comerciais no mercado para a criopreservação de espermatozoides nas mais variadas espécies. Entretanto, ainda não há um diluidor que seja indicado para uso universal. Diversos ajustes têm sido feitos, assim como adaptações de diluidores desenvolvidos para uma espécie e são testados em outras, obtendo sucesso ou não. Assim, compreender as variações espermáticas entre as espécies, a alteração da célula durante a exposição às condições da criopreservação e a elaboração de diluidores compostos de substâncias que podem minimizar as crioinjúrias é a base para a elaboração de diluidores com potencial de competitividade comercial.

### Referências

- Abe Y, Asano T, Wakasa I, Kume A, Yokozawa S, Umemiya-Shirafuji R, Suzuki H.** Cryopreservation of canine spermatozoa using a skim milk-based extender and a short equilibration time. *Reprod Domest Anim.* v.55, p.1548-1553, 2020.
- Alcay S, Berk Toker M, Gokce E, Ustuner B, Tekin Onder N, Sagirkaya H, Nur Z, Kemal Soyulu M.** Successful ram semen cryopreservation with lyophilized egg yolk-based extender. *Cryobiology*, v.71, p.329-33, 2015.
- Almeida-Monteiro PS, Pinheiro RRR, Oliveira-Araújo MS, Sales YS, Nascimento RN, Nunes LT, Pereira VA, Montenegro AR, Melo-Maciel MAP, Salmite-Vandreley CSB.** Sperm vitrification of *Prochilodus brevis* using Powder Coconut Water (ACP-104) in association with different cryoprotectant concentrations. *Aquac Res.*, v.51, p.4565-4574, 2020.
- Anel-Lopez L, Riesco MF, Montes-Garrido R, Neila-Montero M, Boixo JC, Chamorro C, Ortega-**

- Ferrusola C, Carvajal A, Altonaga JR, de Paz P, Alvarez M, Anel L.** Comparing the effect of different antibiotics in frozen-thawed ram sperm: is it possible to avoid their addition? *Front Vet Sci.* v.7, p.656937, 2021.
- Anzar M, Rajapaksha K, Boswall L.** Egg yolk-free cryopreservation of bull semen. *PLoS One*, v.15, p. E0223977, 2019.
- Boonkong S, Hongladdaporn C, Matra A, Siriburee A, Kullawong SW, Khuttaka S, Noimay P.** Effects of Aloe vera extract in semen extender on frozen semen quality of bovine. *Kaen Kaset= Khon Kaen Agric J*, v.47, p.549-554, 2019.
- Breda MC.** *Fitoesteróis e os benefícios na prevenção de doenças: uma revisão.* Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 50f., 2010.
- Brito BF, Santos BMB, Cabral LAR, Maia LCP, Negreiros NAB, Silva HVR, Matta MF de R, Salgueiro CC de M, Nunes JF.** Ram and goat semen immunosexed and diluted in powdered coconut water-based preservation medium (acp101/102c). *Acta Sci Vet*, v.49, 2021.
- Bustamante-Filho IC, Souza APBD, Lazari L, Argenti LE, Weber A.** Avaliação seminal em suínos: aplicabilidades das análises proteômicas. *Rev Bras Reprod Anim*, v.43, p.184-195, 2019.
- Cabral LAR, Pacheco WBM, Santos SSA, Prado AS, Rufino LAL, Salgueiro CCM, Paula NRO, Montenegro AR, Nunes JF.** Use of alternative diluent ACP-Lact® and coconut water powder (ACP) in cryopreservation of goat semen and fixed-time artificial insemination (FTAI) in half-breed goats. *Anim Reprod*, v.20, p.e20230081, 2023.
- Cardoso JFS, Paula, NRO, Uchoa DC, Silva LDM.** Different egg yolk concentrations on the quality of the canine semen diluted in ACP-106 and chilled under 4 °C. *Com Sci*, v.1, p.146, 2010.
- Consuegra C, Crespo F, Dorado J, Diaz-Jimenez M, Pereira B, Ortiz I, Hidalgo M.** Vitrification of stallion sperm using 0.25 ml straws: Effect of volume, concentration and carbohydrates (sucrose/trehalose/raffinose). *Anim Reprod Sci.*, v.206, p.69-77, 2019.
- Costa SCS, Macêdo LFB, Braga CC, Teixeira LSA, Porfirio KP, Mineiro ALBB, Paula NRO.** Técnica do cometa para avaliação da integridade do DNA de espermatozoides caprinos criopreservados em ACP-101/102®. *Ciênc. Ani.*, v.30, p.317–321, 2023.
- Duracka M, Lukac N, Kacaniova M, Kantor A, Hleba L, Ondruska L, Tvrda E.** Antibiotics versus natural biomolecules: the case of in vitro induced bacteriospermia by *Enterococcus faecalis* in rabbit semen. *Molecules.* v.27, p.4329, 2019.
- Farias CFA, Tork ALP, Rique AS, Queirós AFD, Silva SV.** Estudo da eficácia da Aloe vera como crioprotetor vegetal na refrigeração de espermatozoides epididimários de bovinos. *Rev Bras Reprod Anim*, p.787-794, 2019.
- Flores C; Vilanova L.** Metabolismo espermático. *Gac. Cs. Vet.* v.20, p.23-32, 2015.
- Gross F, MacLeod M.** Prospects and problems for standardizing model validation in systems biology. *Prog Biophys Mol Biol.* v.129, p.3-12, 2017.
- Guasti PN; Monteiro GA; Papa FO.** Componentes do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação e fertilidade de espermatozoides equinos. *Vet Zootec.*, v.19, n.2, p.169–180, 2012.
- Güngör İH, Tektemur A, Arkali G, Cinkara SD, Acisu TC, Koca RH, Önalın EE, Kaya SO, Kizil M, Sönmez M, Gür S, Çambay Z, Yüce A, Türk G, Cummins J.** Effect of freeze–thawing process on lipid peroxidation, miRNAs, ion channels, apoptosis and global DNA methylation in ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev.* v.33, p.747-759, 2021.
- Lavanya M, Archana SS, Swathi D, Ramya L, Arangasamy A, Binsila B, Dhali A, Krishnaswamy N, Singh SK, Kumar H, Sivaram M, Selvaraju, S.** Sperm preparedness and adaptation to osmotic and pH stressors relate to functional competence of sperm in *Bos taurus*. *Sci Reports*, v.11, p.22563, 2021.
- Layek SS, Mohanty TK, Kumaresan A, Parks JE.** Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Anim Reprod Sci*, v.172, p.1-9, 2016.
- Lima AS, Bittencourt RF, Ribeiro AL, Loiola MVG, Menezes GFO, Barreto RO, Vasconcelos IC, Silva CC, Jesus EO, Snoeck PPN.** Utilização da lipoproteína de baixa densidade, em diferentes concentrações, em meio diluidor para criopreservação do sêmen ovino. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.71, p.1889–95, 2019.
- Lorenzo CPB, Raimundo DC, Rocha A, Menão MC.** Métodos de purificação da água para laboratórios. *Enciclopédia Biosfera*, v.15, p.107-92, 2018.
- Maia MS.** *Tecnologia do sêmen e inseminação artificial em caprinos e ovinos.* Natal: EMPARN, 2010. 94p.
- MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Animal.** *Portaria*

- SDA n° 612, de 06 de julho de 2022. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-sda-n-612-de-6-de-julho-de-2022-414067462>.
- Meirelles LS, Malschitsky E, Neves AP, Jochims Vieira M, Keller A, Hött AK, Moraes IMA, Garbade P, Gregory RM, Mattos, RC.** Leite em pó desnatado não inativado e leite desnatado UHT para preservação e fertilidade do sêmen equino resfriado. *Cienc Rural* v.28, p.467–70, 1998.
- Mishra AK, Kumar A, Swain DK, Yadav S, Nigam R.** Insights into pH regulatory mechanisms in mediating spermatozoa functions. *Veterinary world*, v.11, p.852–858, 2018. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.852-858>
- Monteiro IFG, Nascimento LF, Amaral, LMM.** Principais alterações físico-químicas em ovos comerciais durante o armazenamento e como minimizá-las. *Sinapse Múltipla*, v.8, p.198-202, 2019.
- Moutinho EDPM, Leão KM, da Silva, RP, do Carmo Silva N, Rodrigues MC, da Silva MAP.** Efeito de diferentes antibióticos na composição do diluente, sobre a viabilidade do sêmen suíno refrigerado. *Pubvet*, v.5, Art-1118, 2011.
- Najafi A, Daghigh-Kia H, Dodaran HV, Mehdipour M, Alvarez-Rodriguez M.** Ethylene glycol, but not DMSO, could replace glycerol inclusion in soybean lecithin-based extenders in ram sperm cryopreservation. *Anim Reprod Sci*, v.177, p.35-41, 2017.
- Nasreen S, Awan MA, Ul-Husna A, Rakha BA, Ansari MS, Holt W, Akhter S.** Honey as an Alternative to Antibiotics for Cryopreservation of Nili-Ravi Buffalo Bull Spermatozoa. *Biopreserv Biobank*. v.18, p.25-32, 2020.
- Nishijima K, Kitajima S, Koshimoto C, Morimoto M, Watanabe T, Fan J, Matsuda Y.** Motility and fertility of rabbit sperm cryopreserved using soybean lecithin as an alternative to egg yolk. *Theriogenology*, v.84, p.1172-1175, 2015.
- Pérez-Marín CC, Requena FD, Arando A, Ortiz-Villalón S, Requena F, Agüera EI.** Effect of trehalose- and sucrose-based extenders on equine sperm quality after vitrification: Preliminary results. *Cryobiology*, v.80 p.62-69, 2018.
- Ramírez-Vasquez RRA, Cano A, Hozbor FA, Cesari A.** Cryopreservation and egg yolk extender components modify the interaction between seminal plasma proteins and the sperm surface. *Theriogenology*, v.140, p.153-163, 2019.
- Rodrigues RB, Uczay M, Brito VB, Nunes Fossati AA, Godoy AC, Moura DJ, Vogel CIG, Nogueira Vasconcelos AC, Streit DP Jr.** Skim milk powder used as a non-permeable cryoprotectant reduces oxidative and DNA damage in cryopreserved zebrafish sperm. *Cryobiology*, v.97, p.76-84, 2020.
- Rondon RMM, Rondon FCM, Nunes JF, Alencar AA, Sousa FM, Carvalho, MAM.** Uso da água de coco em pó (ACP®) em diferentes temperaturas como diluente de espermatozoides de capote (*Numida meleagris*). *Rev Bras Saúde Prod An*, v.9, p.848-854, 2018.
- Santos CS, Silva AR.** Current and alternative trends in antibacterial agents used in mammalian semen technology. *Anim Reprod*. v.17, p.e20190111, 2020.
- Sharaf AE, Khalil WA, Khalifa EI, Nassan MA, Swelum AA, El-Harairy MA.** The supplementation of bee bread methanolic extract to egg yolk or soybean lecithin extenders can improve the quality of cryopreserved ram semen. *Cells*. v.27, p.3403, 2022.
- Shi L, Ren Y, Zhou H, Hou G, Xun W, Yue W, Zhang C, Yang R.** Effect of rapid freezing–thawing techniques on the sperm parameters and ultrastructure of Chinese Taihang black goat spermatozoa. *Micron*, v.57, p.6-12, 2014.
- Silva RAJA, Batista AM, Arruda LCP, Souza HM de, Nery IHAV, Gomes WA, Soares PC, Silva S, Guerra MMP** Concentration of soybean lecithin affects short-term storage success of goat semen related with seminal plasma removal. *Anim Reprod*, v.16, p.895–901, 2019.
- Soares AT, Silva SV, Batista AM, Almeida FC, Nunes JF, Peixoto CA, Guerra MM.** Ultrastructure evaluation of goat spermatozoa after freezing in a skim milk-based extender with Trolox supplementation. *Andrologia*, v.47, p.470-6, 2015.
- Souza AP, Lima GL, Peixoto GCX, Silva AM, Oliveira MF, Silva AR.** Use of Aloe vera–based extender for chilling and freezing collared peccary (*Pecari tajacu*) semen. *Theriogenology*, v.85, p.1432-1438, 2016.
- Strzeżek R, Reksa A.** Effect of different egg yolk sources on dog semen quality following cryopreservation. *Pol J Vet Sci*. v.25, p.187-189, 2022.
- Tarig AA, Wahid H, Rosnina Y, Yimer N, Goh YM, Baiee FH, Khumran AM, Salman H, Ebrahimi M.** Effect of different concentrations of egg yolk and virgin coconut oil in Tris-based extenders on chilled and frozen-thawed bull semen. *Anim Reprod Sci*, v.182, p.21-27, 2017.
- Toniolli R, Barros TB, Toniolli LS, Guimarães DB, Freitas EN, Nunes TGP.** Diferentes

concentrações de gema de ovo em pó adicionada ao diluente ACP-103® na conservação do sêmen suíno. *Ciênc Anim Bras.*, v.17, p.243–51, 2016.

**Trentin JM.** *Tampões e antioxidantes na qualidade do sêmen de pôneis.* 2018. Tese (Doutorado em Medicina Animal: Equinos). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2018.

**Vidal AH, Batista AM, Silva ECB, Gomes WA, Pelinca MA, Silva SV, Guerra MMP.** Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation. *Small Rum Res*, v.109, p.47-51, 2013.

**Yildiz C, Bozkurt Y, Yavas I.** An evaluation of soybean lecithin as an alternative to avian egg yolk in the cryopreservation of fish sperm. *Cryobiology*, v.67, p.91-94, 2013.

**Yong SY, Nguang SI, Kari A.** Comparison between the effect of egg yolk-based extender and Aloe vera (*Aloe barbadensis*) based extender on red tilapia (*Oreochromis niloticus*) sperm quality. *J Fund Applied Sci*, v.9, p.813-820, 2017.

---