

**ROBESPIERRE AUGUSTO JOAQUIM ARAÚJO SILVA**

**UTILIZAÇÃO DE DILUIDOR LIVRE DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL  
PARA REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO**

**GARANHUNS**

**2015**

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

**ROBESPIERRE AUGUSTO JOAQUIM ARAÚJO SILVA**

**UTILIZAÇÃO DE DILUIDOR LIVRE DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL**  
**PARA REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Madalena Pessoa Guerra

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sildivane Valcácia Silva

**GARANHUNS**

**2015**

Ficha Catalográfica

S586u Silva, Robespierre Augusto Joaquim Araújo  
Utilização de diluidor livre de produtos de origem animal  
para refrigeração do sêmen caprino / Robespierre Augusto  
Joaquim Araújo Silva. -- Recife, 2015.  
58 f.: il.

Orientador(a): Maria Madalena Pessoa Guerra.  
Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Sanidade e  
Reprodução de Ruminantes) – Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária,  
Recife, 2015.

Inclui anexo(s) e referências.

1. Lecitina de soja 2. Fosfolipase A 3. Remoção do plasma  
seminal I. Guerra, Maria Madalena Pessoa, orientadora II. Título

CDD 636.39

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


UTILIZAÇÃO DE DILUIDOR LIVRE DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL  
PARA REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO

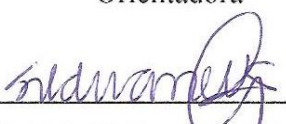
Dissertação elaborada por

**ROBESPIERRE AUGUSTO JOAQUIM ARAÚJO SILVA**

Aprovada em 26 de março de 2015

**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>ª</sup>. Dr.<sup>ª</sup>. Maria Madalena Pessoa Guerra  
Departamento de Medicina Veterinária – DMV/UFRPE  
Orientadora

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>ª</sup>. Dr.<sup>ª</sup>. Sildivane Valcácia Silva  
Departamento de Biotecnologia/CBiotec – UFPB  
Co-orientadora

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Cláudio Coutinho Bartolomeu  
Departamento de Medicina Veterinária – DMV/UFRPE

**GARANHUNS**

**2015**

**Aos meus pais (*Pedro Joaquim e Risoneide Araújo*),  
À minha avó (*Odete – in memoriam*),  
E à minha namorada (*Pamella de Sá*),  
Dedico**

**Muitíssimo obrigado por tudo, amo muito vocês!**

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à enigmática força que rege todo o universo e que é responsável pela concretização de mais uma etapa em minha vida;

Aos meus pais (Pedro Joaquim e Risoneide Araújo) e à minha namorada (Pamella), por todo amor, carinho, ajuda e incentivo. Sem vocês nenhuma conquista seria possível!

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Madalena Guerra (orientadora), pela oportunidade de realizar o mestrado sob sua orientação e de fazer parte dessa grande equipe que constitui o laboratório de andrologia da UFRPE (ANDROLAB);

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sildivane Valcácia Silva (co-orientadora) e ao Dr. André Mariano Batista, grandes mestres, pessoas de uma ciência ímpar e de um coração enorme a quem considero como verdadeiros amigos. Gratíssimo pela paciência, atenção, encorajamento e apoio;

Aos androlabianos (Helder Melo, Lúcia Cristina, Wilton Arruda, Igor Henrique, Ellen Cordeiro, Millena Monteiro, Bruna Sabino, Thalles Maciel, Juliana Arandas, Catharina Albuquerque e Ane Carolin), pelo acolhimento, apoio, amizade e incentivo;

Aos grandes mestres, os professores (Madalena Guerra, Cláudio Coutinho, Gustavo Ferrer, Wilton Jr., Juliene Barros, Allan Borges, Érica Oliveira), por compartilharem comigo um pouco do seu conhecimento e experiências durante as disciplinas ofertadas no mestrado;

Aos colegas do curso de mestrado (Rafael Silva, Thiago Arcoverde, Inalda Angélica, Dolores Campos, Francisco Pinheiro – Dr. Chico da Pitú, Júnior Mário, Flávia Ramalho, Maiana Chaves, Pabóla Santos), pela amizade, bons momentos, troca de experiências, apoio e incentivo;

Aos meus velhos e bons amigos da graduação (Ueliton Assis, Angélica Martina, Gláucia Luna), pela grande amizade, apoio e incentivo;

E à CAPES, pelo apoio financeiro que me possibilitou dedicar-me exclusivamente à execução das minhas atividades da Pós-graduação.

Muito obrigado a todos!

**“Cada um de nós compõe a sua história  
e cada ser em si carrega o dom de ser capaz, de ser feliz”**

**(Renato Teixeira e Almir Sater)**

**“Quem acredita, sempre alcança!”**

**(Renato Russo)**

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de diferentes diluidores [Tris tampão (Tris), Tris-Gema (TG) e Tris-lecitina de soja 1% (LS1) e 2% (LS2)] e do processo de remoção do plasma seminal no sêmen caprino armazenado a 5 °C por 48 horas. O sêmen foi colhido de quatro caprinos (dois Toggenburg e dois Alpino Americano), com vagina artificial, duas vezes por semana, durante quatro semanas. Ejaculados com motilidade superior a 60% foram agrupados e cada *pool* seminal (n=8) foi utilizado em uma repetição. O *pool* foi igualmente dividido, sendo metade diluído, sem remoção do plasma seminal (sêmen não lavado – NL), e envasado em palhetas de 0,25 mL ( $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL). A segunda metade do *pool* foi submetida a remoção do plasma seminal (sêmen lavado – L) por dupla centrifugação (2200 g/10min) e depois diluída e envasada como citado anteriormente. Em seguida, as amostras foram refrigeradas até 5 °C (90 min) e mantidas sob refrigeração por 48 horas. Análise computadorizada da cinética espermática (CASA) e a avaliação da integridade de membrana plasmática (iMP) e acrossomal (iAC) e do potencial de membrana mitocondrial (PMM) foram determinadas cinco minutos após atingir 5 °C (T0), após 24 (T24) e 48 (T48) horas de armazenamento. Nenhuma influência do diluidor ( $p > 0,05$ ) foi observada para as variáveis de cinética espermática do sêmen NL, porém, independente do diluidor, motilidade progressiva (MP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR), velocidade em linha reta (VSL) e velocidade média do percurso (VAP) foram menores ( $p < 0,05$ ) no T48 em relação ao T0, fato também observado para motilidade total (MT) do grupo LS2. No sêmen lavado, MT e MP do grupo Gema foi superior ( $p < 0,05$ ) aos demais grupos durante todo período de refrigeração. Após a remoção do plasma seminal não houve influência do tempo de refrigeração ( $p > 0,05$ ) sobre quaisquer das variáveis cinéticas do grupo LS2. Entretanto, os valores de LIN, STR, VSL para os grupos Tris-Gema e LS1, e MP e VAP para o grupo Tris-Gema, foram inferiores no T48 em relação ao T0. Observou-se, ainda, que no T48 as variáveis de MT, MP, VSL e VAP do grupo LS2, e MP do grupo Tris-Gema foram superior no sêmen lavado quando comparado ao sêmen não lavado. A iMP não foi influenciada pelo tipo de diluidor, porém no sêmen NL a iMP dos grupos Tris-Gema e LS2 foi inferior ( $p < 0,05$ ) no T48 em relação ao T0. Maior ( $p < 0,05$ ) iMP foi observada para o sêmen lavado em relação ao não lavado. A iAC e a cinética (velocidade curvilínea-VCL), não foram influenciadas ( $p > 0,05$ ) pelo diluidor, nem pelo tempo de armazenamento ou pela remoção do plasma seminal. Assim, conclui-se que a lecitina de soja pode ser utilizada como substituto à gema de ovo para refrigeração do sêmen caprino e que a remoção do plasma seminal melhora a conservação do sêmen dessa espécie.

**Palavras-chave:** lecitina de soja, fosfolipase A, remoção de plasma seminal



## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the influence of different extenders [Tris buffer (Tris), Tris-egg yolk (EY) and Tris-soybean lecithin 1% (SL1) and 2% (SL2)] and the removal of seminal plasma process in goat sperm stored at 5 °C for 48 hours. Semen was collected from four goats (two Toggenburg and two American Alpine), using an artificial vagina twice a week for four weeks. Ejaculates with greater than 60% motility were pooled and each pool seminal (n = 8) was used in a repeat. The pool was divided equally, half diluted without removal of seminal plasma (non washed semen – NW), and packaged in straws of 0.25 mL ( $200 \times 10^6$  sperm/mL). The second half of the pool was subjected to removal of the seminal plasma (washed semen - W) by double centrifugation (2200 g/10 min) then diluted and packaged as mentioned above. Then, the samples were chilled to 5 °C (90 min) and kept under refrigeration for 48 hours. Computer analysis of sperm kinetics (CASA) and the evaluation of the plasma membrane (PMi) and acrosomal (ACi) integrity and mitochondrial membrane potential (MMP) were determined within five minutes after reaching 5 °C (T0), and after 24 (T24) and 48 (T48) hours of storage. No influence of extender ( $p > 0.05$ ) was observed for sperm kinetic variables of NW semen, however, independent extender, progressive motility (PM), linearity (LIN), straightness (STR), straightline velocity (VSL) and average path velocity (VAP) were lower ( $p < 0.05$ ) in T48 compared to T0, a fact confirmed for total motility (TM) of SL2 group. In washed semen, TM and MP of EY group was higher ( $p < 0.05$ ) than the other groups throughout the chilling period. After removal of the seminal plasma did not influence the cooling time ( $p > 0.05$ ) in any of the kinetic variables of the SL2 group. However, LIN, STR, VSL values for Tris-EY and SL1 groups, and PM and VAP values for Tris-EY group, were lower in T48 compared to T0. It was observed also that in the T48 TM, PM, VSL and VAP variables of the SL2 group, and PM variable of Tris-EY group were higher in semen washed when compared to non-washed. The PMi was not influenced by the type of extender, but in NW semen PMi of Tris-EY and SL2 groups was lower ( $p < 0.05$ ) in T48 compared to T0. Greater ( $p < 0.05$ ) PMi was observed for the washed compared to non-washed semen. The ACi and kinetics (curvilinear velocity – VCL) were not affected ( $p > 0.05$ ) by extender, or by storage time or the removal of seminal plasma. Thus, it is concluded that soybean lecithin can be used as a substitute for egg yolk for cooling of goat semen and which removal of the seminal plasma enhances the preservation of the caprine semen.

**Keywords:** soybean lecithin, phospholipase A, removal of seminal plasma

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                   | <b>Página</b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Figura 1. Fluxograma do delineamento experimental desde a obtenção do <i>pool</i> à formação dos grupos amostrais.....                                            | 33            |
| Figura 2. Influência de diferentes diluidores e da remoção do plasma seminal sobre a integridade e cinética do sêmen caprino refrigerado a 5 °C por 48 horas..... | 37            |

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AGPI – Ácidos graxos poli-insaturados  
CASA – Computer assisted system analysis  
CEUA – Comissão de ética para uso de animais  
CFDA – Diacetado de carboxifluoresceína  
DHA – Ácido docosahexanóico  
DMSO – Dimetilsufóxido  
EDTA – Etilenodiaminotetracético  
FC – Fosfatidilcolina  
FE – Fosfatidiletanolamina  
FITC-PNA - isotiocianato de fluoresceína conjugado a *Peanut agglutinin*  
TG – Tris-gema de ovo  
IA – Inseminação artificial  
iAC – Integridade de acrossoma  
IP – Iodeto de propidium  
LDL – Lipoproteínas de baixa densidade  
LIN – Linearidade  
LS – Lecitina de soja  
MP – Motilidade progressiva  
MT – Motilidade total  
OEP – Orvus es paste  
PBS – tampão fosfato de sódio  
pH – Potencial hidrogeniônico  
PMM – Potencial de membrana mitocondrial  
SNK – Teste de Student-Neuman-Keuls  
STR – Retilinearidade  
UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco  
VAP – Velocidade média do percurso  
VCL – Velocidade curvilínea  
VSL – Velocidade em linha reta

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                       | <b>Página</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>1</b> <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                       | <b>11</b>     |
| <b>2</b> <b>OBJETIVOS.....</b>                                                                                                        | <b>13</b>     |
| <b>2.1</b> <b>Geral.....</b>                                                                                                          | <b>13</b>     |
| <b>2.2</b> <b>Específicos.....</b>                                                                                                    | <b>13</b>     |
| <b>3</b> <b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                                                                                            | <b>14</b>     |
| <b>3.1</b> <b>Particularidades do Sêmen Caprino.....</b>                                                                              | <b>14</b>     |
| <b>3.2</b> <b>Refrigeração do Sêmen Caprino.....</b>                                                                                  | <b>15</b>     |
| <b>3.3</b> <b>Diluidor de Refrigeração para o Sêmen Caprino.....</b>                                                                  | <b>17</b>     |
| <b>3.3.1</b> <b>Açúcares.....</b>                                                                                                     | <b>17</b>     |
| <b>3.3.2</b> <b>Crioprotetores.....</b>                                                                                               | <b>17</b>     |
| <b>3.3.3</b> <b>Sistema tampão e Osmolaridade.....</b>                                                                                | <b>19</b>     |
| <b>3.3.4</b> <b>Antibióticos.....</b>                                                                                                 | <b>20</b>     |
| <b>3.3.5</b> <b>Aditivos.....</b>                                                                                                     | <b>20</b>     |
| <b>4</b> <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                      | <b>21</b>     |
| <b>ARTIGO: Efeito de diferentes diluidores e da remoção do plasma seminal sobre as variáveis do sêmen refrigerado de caprino.....</b> | <b>28</b>     |
| <b>ANEXO – Orientações para autores – Reproduction in Domestic Animals.....</b>                                                       | <b>46</b>     |

## 1 INTRODUÇÃO

A caprinocultura é uma atividade presente em todos os continentes, sendo o rebanho mundial de caprinos composto por aproximadamente 830 milhões de animais (FAVERO; ALVES, 2010). De acordo com dados da Pesquisa Pecuária Municipal (IBGE, 2013), o Brasil possui um rebanho de aproximadamente 8,8 milhões de caprinos, sendo 91% deste rebanho localizado na Região Nordeste.

Nessa região, principalmente na zona semiárida, a criação de caprinos ainda predomina como uma atividade do tipo subsistência, com manejo reprodutivo, nutricional e sanitário precários (VIDIGAL, 2008; BEZERRA, 2009). No entanto, com a expressiva participação do agronegócio no Produto Interno Bruto nacional, os diversos sistemas produtivos, inclusive a caprinocultura, têm passado por transformações, principalmente relativos aos avanços tecnológicos, tornando a atividade mais competitiva (TEIXEIRA et al., 2013).

A inseminação artificial (IA) é a principal biotecnologia da reprodução utilizada para acelerar o melhoramento genético dos rebanhos, uma vez que propaga o material genético de machos superiores e possibilita a cobertura de milhares de fêmeas por ano (MUNIZ, 2003; FERRA; SERENO, 2006). A utilização prática desta biotécnica em programas reprodutivos de larga escala foi potencializada a partir do desenvolvimento da técnica de criopreservação, o que permitiu o prolongamento artificial do tempo de vida dos espermatozoides, pois reduz (refrigeração) ou cessa (congelamento) a atividade metabólica dessas células (SALAMON; MAXWELL, 2000). No entanto, a conservação pelo frio é um processo altamente estressante (HOLT, 2000a), podendo provocar danos subletais ou mesmo letais às células espermáticas (MEDEIROS et al., 2002).

Para que resultados satisfatórios sejam obtidos com o uso da criopreservação é necessário que, além do equilíbrio entre os diversos fatores que envolvem essa biotécnica, as especificidades fisiológicas do espermatozoide da espécie com a qual se trabalha sejam conhecidas (PURDY, 2006). As glândulas bulbouretrais do caprino liberam no ejaculado enzimas lipolíticas denominadas Fosfolipases A, que, ao interagir com componentes do diluidor à base de gema de ovo e/ou leite, reagem produzindo ácidos graxos e lisolecitinas, que são deletérios ao espermatozoide (LEBOEUF; RESTALL; SALAMON, 2000; PURDY, 2006).

As interações prejudiciais entre estas enzimas e os diluidores à base de gema de ovo e/ou leite podem ser evitadas pela remoção do plasma seminal, através da lavagem do sêmen por centrifugação (MACHADO; SIMPLÍCIO, 1995). No entanto, este é um procedimento complexo e se for mal executado pode comprometer a qualidade das células (LEBOEUF; RESTALL; SALAMON, 2000).

A utilização da gema de ovo e do leite nos diluidores de sêmen deve-se ao fato destes produtos de origem animal possuírem em sua composição proteínas, lipoproteínas e fosfolipídios que auxiliam na manutenção da integridade da membrana plasmática e na manutenção da viabilidade espermática, reduzindo a perda lipídica ou restaurando os lipídios perdidos durante o processo de conservação pelo frio (MACHADO; SIMPLÍCIO, 1995; SILVA; GUERRA, 2011; VIDAL et al., 2013).

Ainda, a gema de ovo e o leite apresentam, além das interações prejudiciais já mencionadas, desvantagens como variabilidade composicional e risco sanitário (BOUSSEAU et al., 1998; AIRES et al., 2003; De PAZ et al., 2010; AKHTER et al., 2012). Tais desvantagens subsidiam a necessidade de buscar alternativas ao uso de componentes de origem animal para elaboração de diluidores de sêmen (AIRES et al., 2003; BITTENCOURT et al., 2008; SILVA; GUERRA, 2011).

Componentes quimicamente definidos, livres de produtos de origem animal, mostraram-se como uma alternativa para compor os diluidores de sêmen (ZHAO et al., 2009). A lecitina de soja (LS), um composto fosfolipídico natural, é constituído principalmente por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol e ácido fosfatídico (DALMAZZO, 2012), além dos ácidos graxos esteárico, oleico e palmítico, os quais prevalecem nas membranas biológicas, conferindo estabilidade estrutural (CRESPILHO et al., 2012). Apesar de possuir composição lipídica compatível com a membrana espermática do caprino, os resultados do uso da lecitina de soja no sêmen dessa espécie são variáveis (BITTENCOURT et al., 2008; PHUTIKANIT et al., 2011; SALMANI et al., 2013; 2014; VIDAL et al., 2013).

Diante do exposto, torna-se necessária a realização de estudos que elucidem a eficiência da utilização da lecitina de soja como crioprotetor para refrigeração do sêmen caprino.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Investigar a influência do diluidor à base de lecitina de soja e da remoção do plasma seminal sobre as variáveis de cinética e integridade pós-refrigeração do sêmen caprino.

### **2.2 Específicos**

Investigar a influência da lecitina de soja (L- $\alpha$ -phosphatidylcholine), nas concentrações de 1 e 2%, como substituto à gema de ovo sobre as variáveis de cinética e integridade do sêmen caprino refrigerado por 48 horas a 5 °C;

Investigar a necessidade de remoção do plasma seminal sobre as variáveis de cinética e integridade do sêmen caprino refrigerado por 48 horas a 5 °C em diluidor à base de lecitina de soja;

Investigar as interações entre o plasma seminal do caprino e o crioprotetor não penetrante utilizado para refrigerar o sêmen caprino por 48 horas a 5 °C.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Particularidades do Sêmen Caprino

Na década de 1950 surgiram os primeiros relatos de interações deletérias entre enzimas contidas no plasma seminal de caprinos e os tradicionais diluidores de sêmen à base de gema de ovo. Machado e Simplício (1995) relatam os achados de Roy em 1957, o qual demonstrou que enzimas, na ocasião classificadas como enzimas coaguladoras da gema de ovo (EYCE), liberadas pelas glândulas bulbouretrais do caprino, quando em contato com os fosfolipídios (lecitina) da gema de ovo produzem lisolecitinas e ácidos graxos que levam à coagulação do meio e, conseqüentemente, morte dos espermatozoides.

Posteriormente, efeito prejudicial semelhante à sobrevivência espermática foi observado por Nunes (1982), que observaram interações deletérias entre frações proteicas, conhecidas como a glicoproteína SBU-III, produzidas pelas secreções das glândulas bulbouretrais dos caprinos e os triglicerídios do diluidor à base de leite desnatado. Ambas as substâncias (EYCE e SBU-III) foram identificadas, posteriormente, como homólogas, sendo conhecidas como Fosfolipase A (LEBOEUF; RESTALL; SALAMON, 2000).

Na tentativa de evitar as interações deletérias entre o plasma seminal do caprino e os componentes de origem animal, comumente utilizados nos diluidores de sêmen, protocolos que visam remoção do plasma seminal por centrifugação em solução tamponada passaram a ser realizados (MACHADO; SIMPLÍCIO, 1995). Contudo, Leboeuf, Restall e Salamon (2000) advertiram que o processo de centrifugação demanda tempo, causa perda de espermatozoides, além de poder danificar essas células.

As interações deletérias entre a Fosfolipase A presente no plasma seminal do caprino e os fosfolipídios dos diluidores ainda são interesse de estudos. Sariözkan et al. (2010) investigaram a influência da remoção do plasma seminal sobre a qualidade pós-descongelamento do sêmen caprino congelado em diluidor não comercial Tris-Gema de ovo (15%) em comparação ao diluidor comercial Bioxcell<sup>®</sup>, que tem por base lecitina de soja. Esses autores observaram que, após remoção do plasma seminal, as amostras criopreservadas no diluidor Tris-Gema apresentaram os piores resultados de motilidade espermática, morfologia, integridade funcional da membrana e capacidade fertilizante, quando comparadas às amostras



não centrifugadas. Contrariamente, não foram evidenciadas alterações significativas da criopreservação com diluidor Bioxcell<sup>®</sup>, com ou sem remoção do plasma seminal.

A ausência de interações entre o plasma seminal do caprino e os fosfolipídios dos diluidores à base de soja foram também constatados por Roof et al. (2012), os quais, após criopreservar o sêmen caprino em diluidores comerciais à base de gema de ovo (Irvine TYB) e lecitina de soja (Bioxcell<sup>®</sup>), constataram que na fase de estabilização pelo menos 10% das amostras diluídas em gema de ovo apresentaram extrema redução da motilidade, característica não observada pelo grupo diluído em lecitina de soja.

### **3.2 Refrigeração de Sêmen Caprino**

A criopreservação do sêmen é uma biotécnica que trouxe diversos benefícios à reprodução animal, seja destinada a animais de interesse econômico ou àqueles ameaçados de extinção, ou ainda no tratamento da infertilidade masculina (WATSON, 2000). Essa biotécnica pode ser empregada de duas formas básicas: para refrigerar ou para congelar o sêmen (YOSHIDA, 2000).

A refrigeração do sêmen caprino ocorre em faixas de temperaturas que variam de 2 a 15 °C, comumente de 4 a 5 °C (LEBOEUF; RESTALL; SALAMON, 2000). Esse procedimento tem como princípio básico a redução reversível da motilidade e da atividade metabólica da célula espermática por meio da diminuição gradativa da temperatura (SIMPLÍCIO; MACHADO, 1995). Bezerra (2010) relata que a cada 10 °C reduzidos em relação à temperatura corporal, o metabolismo espermático é reduzido à metade; assim, ao atingir a temperatura de 5 °C, o espermatozoide utiliza apenas cerca de 10% do seu metabolismo para sobreviver.

Apesar de a refrigeração permitir a manutenção dos espermatozoides por período de tempo reduzido (2 a 4 dias), o sêmen refrigerado apresenta-se como uma alternativa vantajosa ao congelado, quando da utilização desse material num curto período de tempo, pois a refrigeração provoca menos danos às células espermáticas, permite redução da dose inseminante (VISHWANATH; SHANNON, 2000) e produz resultados de fertilidade comparáveis ao do sêmen fresco (BATISTA et al., 2009).

Entretanto, as células espermáticas não são adaptadas às variações de temperatura que ocorrem durante o processo de criopreservação (HOLT, 2000a) e este processo ocorre ao custo da viabilidade e da função normal (MEDEIROS et al., 2002). Portanto, é necessário que

a criopreservação seja realizada de forma cautelosa, uma vez que lesões irreversíveis podem ser causadas durante a redução da temperatura, ocorrendo o fenômeno conhecido como choque térmico (SALAMON; MAXWELL, 2000; WATSON, 2000).

O choque térmico ocorre durante a refrigeração, quando os espermatozoides são submetidos a uma rápida redução na temperatura para valores próximos a 0 °C. Os efeitos deletérios do choque térmico são decorrentes dos danos às membranas espermáticas e tais danos provavelmente estão relacionados à fase de transição lipídica da membrana do espermatozoide (HOLT, 2000a; WATSON, 2000). De acordo com Holt (2000b) e Salamon e Maxwell (2000), o choque térmico pode ser minimizado pela utilização de curvas lentas de refrigeração.

Além da mudança na fase de transição lipídica, os danos de membrana associados à criopreservação podem ocorrer devido a alterações composicionais na membrana espermática (CHAKRABARTY et al., 2007). A membrana do espermatozoide caprino é rica em fosfolipídios, principalmente fosfatidilcolina (FC), fosfatidiletanolamina (FE) e esfingomiélna, e em ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), dentre os quais os mais abundantes são oleico, linoleico, araquidônico e docosahexaenoico (DHA), associado a um baixo teor de colesterol (RANA et al., 1991; 1993).

Chakrabarty et al. (2007), ao analisarem os danos de membrana decorrentes do processo de criopreservação de espermatozoides do epidídimo de caprinos, observaram redução no conteúdo de FC, FE e de AGPI, em especial, o DHA, fato que pode estar relacionado à perda da função espermática. Portanto, esses autores sugerem a adição de fosfolipídios ou fontes de fosfolipídios aos meios de criopreservação, corroborando os relatos de Holt (2000b) e Salamon e Maxwell (2000), de que a adição de lipídios aos diluidores de sêmen também podem minimizar os efeitos deletérios do choque térmico.

Como observado, o diluidor tem um papel fundamental na manutenção da viabilidade do sêmen caprino criopreservado, por fornecer aos espermatozoides um ambiente adequado para sua preservação temporária, tais como suprimento energético e proteção contra as crioinjúrias (PURDY, 2006). No entanto, Joshi et al. (2006) alertaram para o fato de que a composição dos diluidores e a natureza dos crioprotetores utilizados influenciam diretamente nos danos originados durante o processo de criopreservação espermática.

### **3.3 Diluidor de Refrigeração para o Sêmen Caprino**

O diluidor empregado na refrigeração do sêmen caprino deve conter, no mínimo, cinco itens básicos: açúcar, crioprotetor não penetrante, sistema tampão, sais e antibióticos (PURDY, 2006; CASTELO; FROTA; SILVA, 2008).

#### **3.3.1 Açúcares**

Os açúcares servem como fonte energética aos espermatozoides e auxiliam na manutenção da pressão osmótica dos diluidores, atuando como crioprotetores não penetrantes (PURDY, 2006; FARSHAD; AKHONDZADEH, 2008). Os açúcares de baixo peso molecular, os monossacarídeos glicose e frutose, são utilizados pelos espermatozoides como fonte direta de energia (SALAMON; MAXWELL, 2000), através da via glicolítica e da fosfolilação oxidativa mitocondrial, oferecendo suporte à manutenção e ao movimento espermático (NAING et al., 2010).

De acordo com Purdy (2006), apesar de a frutose ser o substrato primário da glicólise no plasma seminal do caprino, a glicose é um excelente substrato energético para o metabolismo espermático nessa espécie. Entretanto, Naing et al. (2010) não observaram diferenças entre a utilização da glicose ou frutose no sêmen caprino criopreservado.

#### **3.3.2 Crioprotetores**

Os crioprotetores são substâncias que, quando adicionadas ao diluidor seminal, proporcionam um ambiente favorável à manutenção dos espermatozoides e conferem proteção contra os danos ocasionados durante o processo de criopreservação. Essas substâncias são classificadas de acordo com a capacidade de atravessar a membrana espermática, ou seja, em penetrantes ou não penetrantes (CASTELO; FROTA; SILVA, 2008; SILVA; GUERRA, 2011).

Os crioprotetores não penetrantes atuam extracelularmente e, de acordo com Purdy (2006), agem em nível de membrana espermática, modificando-a, ou funcionam como soluto e reduzem o ponto de congelação do meio. Os principais crioprotetores não penetrantes utilizados tem como base gema de ovo e/ou leite desnatado (LEBOEUF; RESTALL; SALAMON, 2000; BITTENCOURT et al., 2008; SILVA; GUERRA, 2011), uma vez que as

lipoproteínas e a lecitina (fosfatidilcolina) da gema de ovo, bem como a lactose e as caseínas protegem as células espermáticas contra o choque térmico (CASTELO; FROTA; SILVA, 2008; DALMAZZO, 2012).

Devido à sensibilidade do sêmen caprino aos diluidores que contém gema de ovo e/ou leite, bem como à variabilidade composicional e aos riscos sanitários decorrentes da presença desses produtos de origem animal como crioprotetores não penetrantes nos diluidores de sêmen, crioprotetores livres de substratos de origem animal, tais como a lecitina de soja (LS), tem sido utilizados na criopreservação de espermatozoides caprinos (BITTENCOURT et al., 2008; PHUTIKANIT et al., 2011; SALMANI et al., 2013; 2014; VIDAL et al., 2013), bovinos (AIRES et al., 2003; CRESPILO et al., 2012; 2014), bubalinos (AKHTER et al., 2010; 2011; 2012), caninos (BECCAGLIA et al., 2009; DALMAZZO, 2012; KASIMANICKAM et al., 2012), ovinos (FOROUZANFAR et al., 2010; De PAZ et al., 2010; DEL VALLE et al., 2012), equinos (PAPA et al., 2011) e suínos (ZHANG et al., 2009).

A lecitina de soja possui um elevado conteúdo de lipoproteínas de baixa densidade (FOROUZANFAR et al., 2010) e, portanto, tem se mostrado uma alternativa viável à gema de ovo utilizada nos diluidores de sêmen. Resultados positivos nos parâmetros cinéticos e integridade das membranas espermáticas têm sido obtidos com a utilização de diluidores com base em LS (BECCAGLIA et al., 2009; ZHANG et al., 2009; AKHTER et al., 2010; 2011; PAPA et al., 2011; EMAMVERDI et al., 2013; VIDAL et al., 2013; SALMANI et al., 2013; 2014).

Os testes de fertilidade com o sêmen criopreservado com LS têm apresentado resultados divergentes. Taxas de fertilidade semelhantes ou superiores aos diluidores contendo gema de ovo tem sido obtidas para o sêmen bovino (AIRES et al., 2003; CRESPILO et al., 2014), ovino (KHALIFA; LYMBEROPOULOS; THEODOSIADOU, 2013), caprino (SARIÖZKAN et al., 2010) e bubalino (AKHTER et al., 2010; 2012). No entanto, na espécie equina o sêmen criopreservado com LS determinou taxas de fertilidade inferiores as do sêmen congelado com gema de ovo (PAPA et al., 2011).

Diferentes diluidores com base em LS estão disponíveis comercialmente, tais como o Bioxcell<sup>®</sup>, AndroMed<sup>®</sup> e Biociphos Plus<sup>®</sup> (AKHTER et al., 2012). No entanto, as formulações comerciais não permitem avaliar diretamente o efeito da LS (CRESPILO et al., 2012), sendo necessário que condições ótimas de preparação, manuseio e armazenamento sejam determinadas a fim de se otimizar o uso da LS na criopreservação de sêmen (De PAZ et al., 2010).

Lecitinas de soja comerciais com menor teor de fosfatidilcolina, aproximadamente 20%, têm apresentado melhores resultados na preparação do diluidor seminal. Conseqüentemente, concentrações elevadas de FC reduzem a proporção fosfolipídica total e aumentam a viscosidade do meio, provocando prejuízo dos parâmetros cinéticos dos espermatozoides (De PAZ et al., 2010; DALMAZZO et al., 2012). Além disso, quando utilizadas em concentrações de 1 a 3%, a LS promove melhoria nos parâmetros cinéticos e integridade de membranas de espermatozoides criopreservados de ovinos e caprinos (FOROUZANFAR et al., 2010; PHUTIKANIT et al., 2011). No entanto, para outras espécies, maiores concentrações são necessárias para obtenção de resultados semelhantes (ZHANG et al., 2009; AKHTER et al., 2012).

### 3.3.3 Sistema tampão e Osmolaridade

O metabolismo espermático produz ácido láctico, que provoca redução do potencial hidrogeniônico (pH) no diluidor. Além disso, possíveis bactérias presentes no sêmen diluído produzem metabólitos que também contribuem para redução do pH do meio (YÁNIZ; MATEOS; SANTOLARIA, 2011). A respiração celular é favorecida na faixa de pH de 7,2 a 7,5 (MACHADO; SIMPLÍCIO, 1995). Entretanto, valores de pH mais próximos à neutralidade (6,8 a 7,1) são considerados ótimos para os meios de preservação espermática (BORGES, 2008). Purdy (2006) relata que a maioria dos diluidores de sêmen caprino tem pH entre 6,0 a 8,0 e alerta para o fato de que grandes flutuações no pH devem ser evitadas, uma vez que podem resultar em perda da capacidade fecundante ou mortalidade espermática.

Em condições naturais, a capacidade tampão do sêmen caprino é realizada pelo plasma seminal. Porém, devido ao comum procedimento de remoção do plasma seminal *in vitro*, tornou-se necessária a adição de substâncias tamponantes aos diluidores. Dessa forma, substâncias como o citrato de sódio, fosfato, Tris e os tampões zwitteriônicos (TES, BES, HEPES e MOPS) podem ser utilizadas para manter o pH dos diluidores (PURDY, 2006).

A viabilidade para o espermatozoide caprino ocorre numa ampla faixa de gradiente osmótico (250 a 625 mOsm). No entanto, a osmolaridade do meio deve ser mantida na faixa de 300 a 320 mOsm (MACHADO; SIMPLÍCIO, 1995). De acordo com Purdy (2006), o espermatozoide caprino tem predileção por um meio um pouco mais hiperosmótico. Dessa forma, menos danos ocorrem quando essas células são criopreservadas em diluidores com osmolaridade entre 425 e 525 mOsm.

### 3.3.4 Antibióticos

A colheita de sêmen não é um procedimento estéril, sendo difícil se evitar quaisquer graus de contaminação durante esse procedimento (YÁNIZ et al., 2010). Além disso, os principais crioprotetores não penetrantes (gema de ovo e/ou leite) utilizados na criopreservação do sêmen apresentam grande susceptibilidade à contaminação bacteriana com consequente comprometimento da qualidade espermática (BOUSSEAU et al., 1998).

Para controlar o crescimento microbiano, Salamon e Maxwell (2000) indicam a utilização dos antibióticos penicilina e estreptomicina aos diluidores seminais. No entanto, segundo estudos de Yániz et al. (2010), a contaminação do sêmen ovino refrigerado a 15 °C por enterobactérias que demonstraram-se sensíveis à gentamicina e ao ceftiofur. Portanto, os autores sugerem que essas drogas podem ser uma boa alternativa à penicilina e estreptomicina.

### 3.3.5 Aditivos

Além dos componentes anteriormente descritos, outras substâncias, tais como emulsificantes e antioxidantes, podem ser adicionadas aos diluidores de criopreservação com o intuito de prolongar a integridade dos espermatozoides criopreservados.

Substâncias emulsificantes ou detergentes tais como o Equex STM Paste<sup>®</sup> e o Orvus es Paste<sup>®</sup> (OEP), que tem por princípio ativo o dodecil-sulfato de sódio e o lauril sulfato de sódio, respectivamente, podem ser adicionadas aos diluidores de sêmen com o objetivo de solubilizar os glóbulos de gordura contidos no diluidor, tornando-os mais disponíveis à incorporação na membrana espermática (BORGES, 2003; MAIA et al., 2008; CASTELO; FROTA; SILVA, 2008).

Maia et al. (2008) observaram que a adição de OEP (0,5% e 1%) ao diluidor Tris-gema melhorou a congelabilidade do sêmen de carneiros Santa Inês, com resultados superiores de motilidade total e progressiva, assim como integridade de membrana plasmática. A utilização de 0,5% de Equex<sup>®</sup> combinado ao Tris-gema ou ao Tris-gema + EDTA na congelação do sêmen caprino resultou em valores superiores de motilidade total e progressiva e de vigor espermático (BITTENCOURT et al., 2008).

#### 4 REFERÊNCIAS

- AIRES, V. A. et al. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. **Theriogenology**, v.60, p.269-279, 2003.
- AKHTER, S. et al. Cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in Bioxcell<sup>®</sup> extender. **Theriogenology**, v.74, p.951-955, 2010.
- AKHTER, S. et al. Soya-lecithin in extenders improves the freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.815-819, 2012.
- AKHTER, S. et al. *In vitro* evaluation of liquid-stored buffalo semen at 5 °C diluted in soya lecithin based extender (Bioxcell<sup>®</sup>), Tris-citric egg yolk, skim milk and egg yolk-citrate extenders. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, p. 45-49, 2011.
- BATISTA, M. et al. Successful artificial insemination using semen frozen and stored by an ultrafreezer in the Majorera goat breed. **Theriogenology**, v.71, p.1307-1315, 2009.
- BECCAGLIA, M. et al. Tris-Lecithin extender supplemented with antioxidante catalase for chilling of canine semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44. Sulp. 2, p. 345-349, 2009.
- BEZERRA, F. S. B. Conservação do sêmen caprino sob refrigeração ou congelação. **Acta Veterinaria Brasilica**. v.4, Supl., p.S20-S25, 2010.
- BEZERRA, F. S. B. **Criopreservação do sêmen caprino: efeito de diferentes palhetas, taxas de descongelamento e crioprotetores**. 2009. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró, RN, Dez. 2009.

BITTENCOURT, A. L. R. et al. Efeito de um quelante de cálcio, um detergente e da lecitina de soja sobre a qualidade do sêmen caprino congelado-descongelado. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.45, n.4, p.305-312, 2008.

BORGES, J. C. **Utilização de antioxidantes associados ou não a emulsificante na criopreservação do sêmen bovino**. 2003. 73f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, Abr. 2003.

BORGES, J. C. **Efeito da utilização de antioxidante no diluidor para a criopreservação de sêmen bovino avaliado através de testes complementares, inseminação artificial e fecundação *in vitro***. 2008. 94f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Campus de Jaboticabal. Jaboticabal, São Paulo, SP, Brasil, 2008.

BOUSSEAU, B. et al. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk source and the *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. **Theriogenology**, v.50, p.699-706, 1998.

CASTELO, T. Z.; FROTA, T. R.; SILVA, A. R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2. n.3, p.67-75, 2008.

CHAKRABARTY, J. et al. Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. **Cryobiology**, v.54, p.27-35, 2007.

CRESPILHO, A. M. et al. Comparison of *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or new lecithin based extenders. **Livestock Science**. v.149, pag.1-6, 2012.

CRESPILHO, A. M. et al. Sperm fertility and viability following 48 h of refrigeration: Evaluation of different extenders for the preservation of bull semen in liquid state. **Animal Reproduction Science**, v.146, p.126-133, 2014.



DALMAZZO, A. **Utilização da lecitina de soja para refrigeração e criopreservação do sêmen de cães**. 2012. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal. São Paulo, SP, Nov. 2012.

DEL VALLE, I. et al. Soy lecithin interferes with mitochondrial function in frozen-thawed ram spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.33, n.4, p.717-725, 2012.

EMAMVERDI, M. et al. Optimization of ram semen cryopreservation using a chemically defined soybean lecithin-based extender. **Reproduction in Domestic Animals**, v.48, p. 899-904, 2013.

FARSHAD, A.; AKHONDZADEH, S. Effects of sucrose and glycerol during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. **Asian-Australian Journal of Animal Sciences**, v.21, n.12, p.1721-1727, 2008.

FAVERO, L. A.; ALVES, R. S. Ovinocaprinocultura. **Fundação Banco do Brasil**, v.7, p.14-21, 2010.

FERRA, J. C.; SERENO, J. R. B. Inseminação artificial em ovinos. **Documentos** 156. Embrapa. Planaltina, DF, 2006. Disponível em: <[www.cpac.embrapa.br/download/363/t](http://www.cpac.embrapa.br/download/363/t)>. Acesso em: 23 de janeiro de 2015.

FOROUZANFAR, N. et al. In vitro comparison of egg-yolk based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. **Theriogenology**, v.73, p.480-487, 2010.

HOLT, W. V. Basic aspects on frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.3-22, 2000a.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v.53, p.47-58, 2000b.

IBGE. Pesquisa Pecuária Municipal, 2013. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/>

bda/tabela/protabl.asp?c=3939&z=p&o=27&i=P>. Acesso em: 16 de janeiro de 2015.

JOSHI, A. et al. Influence of osmolality of complete semen extender on motion characteristics of frozen-thawed ram spermatozoa. **Asian-Australian Journal of Animal Sciences**, v.19, n.12, p.1716-1721, 2006.

KASIMANICKAM, V. R. et al. Effect of extenders on sperm mitochondrial membrane, plasma membrane and sperm kinetics during liquid storage of canine semen at 5 °C. **Animal Reproduction Science**, v.136, p.139-145, 2012.

KHALIFA, T.; LYMBEROPOULOS, A; THEODOSIADOU, E. Association of soybean-based extenders with field fertility of stored ram (*Ovis aries*) semen: A randomized double-blind parallel group design. **Theriogenology**, v. 79, p.517-527, 2013.

LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.113-141, 2000.

MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A. A. Inseminação artificial em caprinos no Brasil: estágio atual. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.19, n.1-2, p.61-72. 1995.

MAIA, M. S. et al. Efeito da adição de lauril sulfato de sódio (OEP) ao diluidor na viabilidade do sêmen congelado de ovinos Santa Inês. **Veterinária e Zootecnia**, v.15, n.3, p.521-530, 2008.

MEDEIROS, C. M. O. et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, p. 327-344, 2002.

MOLÍNIA, F. C.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Fertility of ram spermatozoa pellet-frozen in zwitterions-buffered diluents. **Reproduction, Nutrition, Development**, v.36, p.21-29, 1996.

MUNIZ, A. P. **Inseminação artificial em caprinos**. 2003. 45f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária). Universidade Paulista. São Paulo, SP, 2003.

- NAING, S. W. et al. Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v.122, p.23-28, 2010.
- PAPA, F. O. et al. Replacing egg yolk with soybean lecithin in the cryopreservation of stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v.129, p.73-77, 2011.
- De PAZ, P. et al. Development of extender based on soybean lecithin for its application in liquid ram semen. **Theriogenology**, v.74, p.663-671, 2010.
- PHUTIKANIT, N. et al. Effect of sources and concentrations of soybean phosphatidylcholine on diluted goat semen equilibrated at 4°C. **Journal of Agricultural Science and Technology A.**, v.1, p.1170-1173, 2011.
- PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v.63. p.215-225, 2006.
- RANA, A. P. S. et al. Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1061, p.185-196, 1991.
- RANA, A. P. S. et al. Phospholipid asymmetry of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1210, p.1-7, 1993.
- RASUL, Z. et al. Effect of buffering system on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrossome morphology of buffalo spermatozoa. **Animal Reproduction Science**. v.59, p.31-41, 2000.
- ROOF, D. J. et al. Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. **Theriogenology**, v.77, p.412-420, 2012.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.77-111, 2000.

SALMANI, H. et al. Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing. **Small Ruminant Research**. v.112, p. 123-127, 2013.

SALMANI, H. et al. In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. **Cryobiology**, v.68, p.276-280, 2014.

SARIÖZKAN, S. et al. Effects of different extenders of centrifugation/washing on postthaw microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of Angora buck sperm. **Theriogenology**, v.73, p.316-323, 2010.

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

TEIXEIRA, I. A. M. et al. Inovações tecnológicas na caprinocultura. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.14, n.1, p.104-120 jan./mar., 2013.

TULI, R. K.; HOLTZ, W. The effect of zwitterion buffers on the freezability of boer goat semen. **Theriogenology**, v.37, p.947-951, 1992.

VIDAL, A. H. et al.. Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat semen cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v.109, p.47-51, 2013.

VIDIGAL, K. M. **Integridade e funcionalidade da membrana plasmática, acrossomo e mitocôndrias espermáticas em caprinos segundo a conformação escrotal**. 2008. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal do Piauí. Centro de Ciências Agrárias. Teresina, PI, 2008.

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. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.481-492, 2000.

YÁNIZ, J. L. et al. Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effect on sperm quality during storage at 15 °C. **Animal Reproduction Science**, v.122, p.142-149, 2010.

YÁNIZ, J. L.; MATEOS, J. A.; SANTOLARIA, P. Zwitterionic buffers preserve ram semen quality more efficiently than TRIS during storage at 15 °C. **Small Ruminant Research**, v.95, p.54-60, 2011.

YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.349-355, 2000.

ZHANG, S.-S. et al. The cryoprotective effects of soybean lecithin on boar spermatozoa quality. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.22, p.6476-6480, 2009.

ZHAO, B.-T. et al. Protocol optimization for long-term liquid storage of goat semen in a chemically defined extender. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, p.865-872, 2009.

**ARTIGO: Efeito de diferentes diluidores e da remoção do plasma seminal sobre as variáveis do sêmen refrigerado de caprino <sup>1</sup>**

**RAJ Araújo Silva<sup>2</sup>, AM Batista<sup>2</sup>, LCP Arruda<sup>2</sup>, HM Souza<sup>2</sup>, IHAV Nery<sup>2</sup>, WA Gomes<sup>2</sup>,  
PC Soares<sup>3</sup>, SV Silva<sup>4</sup>, MMP Guerra<sup>2</sup>**

*<sup>2</sup>Laboratório de Andrologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil; <sup>3</sup>Laboratório de Doenças Nutricionais e Metabólicas de Ruminantes, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil; <sup>4</sup>Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil*

**Título resumido:** Refrigeração de sêmen caprino: diluidor vs. lavagem

**Resumo**

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito de diferentes diluidores e da remoção do plasma seminal sobre a cinética espermática e a integridade do sêmen caprino armazenado a 5 °C por 48 horas. Oito *pools* de sêmen foram utilizados nesse estudo. Cada *pool* foi igualmente dividido e a primeira metade foi diluída ( $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL) sem remoção do plasma seminal (sêmen não lavado – NL) nos diluidores Tris tampão (Tris), Tris-Gema de ovo (TG) e Tris-Lecitina de Soja 1% (LS1) e 2% (LS2). A segunda metade foi submetida à centrifugação para remover o plasma seminal (sêmen lavado – L) e, em seguida, diluída como mencionado anteriormente. Após diluição, as amostras foram envasadas em palhetas (0,25mL), refrigeradas até 5 °C e armazenadas sob refrigeração (5 °C) por 48 horas. Cinética

---

<sup>1</sup> Reproduction in Domestic Animals

espermática e a integridade de membrana plasmática, da membrana acrossomal e o potencial de membrana mitocondrial foram determinadas cinco minutos após atingir 5 °C (T0) e após 24 (T24) e 48 (T48) horas de armazenamento. Não houve diferença entre diluidores para manutenção da cinética espermática e da integridade de membrana plasmática e acrossomal pós-refrigeração do sêmen não lavado de caprino. A remoção do plasma seminal mostrou-se benéfica à refrigeração do sêmen caprino, pois reduziu a deterioração da qualidade seminal ao longo do tempo. No sêmen lavado, LS demonstrou-se ineficiente para manter a motilidade espermática em comparação ao TG. Conclui-se que a lecitina de soja pode ser utilizada como substituto à gema de ovo para refrigeração do sêmen caprino e que a remoção do plasma seminal melhora a conservação do sêmen dessa espécie.

### **Abstract**

The objective of this study was to investigate the effect of different extenders and removal of seminal plasma on sperm kinetics and the integrity of goat semen stored at 5 °C for 48 hours. Eight semen pools were used in this study. Each pool was divided equally and the first half was diluted ( $200 \times 10^6$  spermatozoa/mL) without removal of seminal plasma (semen non washed - NW) in extenders Tris buffer (Tris), Tris-egg yolk (TG) and Tris-lecithin soybean 1% (SL1) and 2% (SL2). The second half was subjected to centrifugation to remove seminal plasma (washed semen - W) and then diluted as mentioned above. After dilution, the samples were packaged in straws (0.25 mL), chilled to 5 °C and stored under refrigeration (5 °C) for 48 hours. Kinetics sperm and plasma membrane and acrossoma membrane integrity, and the mitochondrial membrane potential were determined within five minutes after reaching 5 °C (T0) and after 24 (T24) and 48 (T48) hours storage. There was no difference between extenders for maintenance of sperm kinetics and plasma membrane and acrossomal membrane integrity post-cooling of non washed goat semen. The removal of the seminal plasma was

beneficial for cooling of goat semen, therefore, reduced deterioration of sperm quality over time. In the washed semen, SL proved to be inefficient to keep sperm motility compared to TG. It concludes that the soybean lecithin can be used as a substitute for egg yolk for cooling goat semen and which removal of the seminal plasma enhances the preservation of the goat semen.

## **1. Introdução**

A inseminação artificial é a principal biotécnica utilizada para acelerar o melhoramento genético dos rebanhos (Vishwanath e Shannon 2000). A utilização prática desta biotécnica em programas reprodutivos de larga escala foi potencializada a partir do desenvolvimento da técnica de criopreservação, a qual permitiu o prolongamento do tempo de vida dos espermatozoides, pois reduz (refrigeração) ou cessa (congelamento) a atividade metabólica dessas células (Salamon e Maxwell 2000).

A congelamento permite a manutenção dos espermatozoides por tempo indeterminado (Yoshida 2000). No entanto, este processo é extremamente estressante às células espermáticas e resulta em danos ultraestruturais, bioquímicos e funcionais com prejuízo à motilidade, viabilidade e fertilidade (Leboeuf et al. 2000). Por outro lado, a refrigeração mantém os espermatozoides por períodos de tempo reduzido (2 a 4 dias), apresentando vantagens como menos danos às células espermáticas, redução do número de espermatozoides por inseminação (Vishwanath e Shannon 2000) e manutenção de capacidade fertilizante comparável ao sêmen fresco (Batista et al. 2009).

Os principais crioprotetores não penetrantes utilizados nos meios de refrigeração do sêmen caprino são gema de ovo e/ou leite desnatado (Purdy 2006). No entanto, estes produtos de origem animal apresentam variabilidade composicional e risco sanitário (Bousseau et al. 1998). Além disso, na espécie caprina, a enzima Fosfolipase A presente no plasma seminal



degrada os lipídios da gema e do leite, produzindo ácidos graxos e lisolecitinas que são deletérios aos espermatozoides (Leboeuf et al. 2000; Purdy 2006).

A eficiência da utilização de diluidores livres de produtos de origem animal, tais como fosfatidilcolina ou lecitina de soja (LS), vem sendo amplamente investigada (Aires et al. 2003; Forouzanfar et al. 2010; Akhter et al. 2011; Vidal et al. 2013). A LS apresenta composição de fosfolipídios e ácidos graxos compatível com a membrana plasmática de mamíferos (Crespilho et al. 2012), além de conter um teor elevado de LDL (Forouzanfar et al. 2010), demonstrando ser alternativa potencial à gema e ao leite. Esse composto fosfolipídico se adere firmemente à superfície da membrana espermática, formando uma barreira física contra os danos da criopreservação (Ricker et al. 2006).

Diluidores à base de LS vem sendo utilizados para congelação do sêmen caprino. No entanto, ainda não há um consenso quanto à concentração de lecitina empregada no diluidor (Phutikanit et al. 2011; Salmani et al. 2013, 2014; Vidal et al. 2013; Chelucci et al. 2015) nem quanto à necessidade de remoção do plasma seminal previamente à criopreservação (Sariözkan et al. 2010; Roff et al. 2012). Até o momento, as informações são limitadas quanto ao uso de diluidores à base de LS em substituição ao leite e/ou à gema para o armazenamento do sêmen caprino a 5 °C, na presença ou ausência de plasma seminal.

Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a influência do diluidor à base de lecitina de soja e da remoção do plasma seminal sobre as variáveis de cinética e integridade espermática pós-refrigeração do sêmen caprino.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1. Animais, Colheita e Avaliação do Sêmen Fresco*

Foram utilizados quatro bodes (dois Toggenburg e dois Alpino Americano), com dois a cinco anos de idade, com histórico de fertilidade. Os animais foram mantidos sob sistema de

confinamento na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), em Recife, PE, Brasil (8°03'14" S, 34°52'52" W) e alimentados com feno de capim tifton e ração peletizada comercial (400g/dia), além de suplementação mineral e água *ad libitum*. Todos os procedimentos envolvendo os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da UFRPE (Licença nº 008/2014/CEUA).

A colheita de sêmen foi realizada com vagina artificial, com auxílio de uma fêmea em estro como manequim. Foram realizadas duas colheitas por semana durante quatro semanas (n=8). Inicialmente, as amostras de sêmen foram analisadas para os parâmetros de movimento de massa (turbilhonamento) e motilidade total, usando microscópio de contraste de fase (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan). A concentração espermática foi obtida através da contagem em Câmara de Neubauer (diluição 1:400). A análise de morfologia espermática foi realizada por meio de câmara úmida (Mies Filho, 1987). O sêmen de cada reprodutor foi avaliado separadamente e após aprovado (turbilhonamento  $\geq 3$ ; motilidade total  $\geq 60\%$ ; concentração  $\geq 1,0 \times 10^9$  espermatozoides/mL; patologias  $\leq 20\%$ ), foi realizada a formação do *pool* destinado à refrigeração.

## 2.2. Preparação dos diluidores

Quatro diferentes diluidores foram preparados neste estudo. O tampão base – Tris (250,0 mM Tris + 88,5 mM Ácido Cítrico + 69,38 mM Glicose + 10,0 mM Hepes + 100 UI penicilina + 50 mg estreptomicina + 100 mL água ultrapura; pH 7,2). O diluidor à base de gema de ovo, Tris-gema de ovo – TG (80 mL do tampão base + 20 mL gema de ovo).

Para a preparação do diluidor Tris-lecitina de soja (LS), 1% e 2% (p/v) de LS (P5638, Sigma, St. Louis, MO, USA) foram adicionados ao tampão base e mantidos em hidratação por 1 hora em temperatura ambiente (25 °C). Em seguida, as suspensões foram homogeneizadas em misturador magnético até a formação de uma solução homogênea. Posteriormente, as

soluções foram mantidas em um banho ultrassônico por 30 minutos (25 °C), para fragmentação das micelas, seguindo metodologia descrita por Mozafari (2010).

Após sonicação, os debris foram removidos e a solução clarificada através do processo de centrifugação (2200 g/30min) e dupla filtração (primeiro em filtro de 3µm e depois 0,45µm), conforme descrito por De Paz et al. (2010).

### 2.3. Procedimento experimental

O experimento foi desenhado para investigar a influência da utilização de um diluidor à base de lecitina de soja nas concentrações de 1% (SL1) e 2% (SL2) e do processo de remoção do plasma seminal, sobre a qualidade espermática do sêmen caprino mantido a 5 °C por 48 horas. Para tanto, cada *pool* seminal foi dividido em duas partes de igual volume. Metade da amostra foi diretamente diluída, sem remoção do plasma seminal (sêmen não lavado – NL), nos diferentes diluidores. A segunda metade da amostra foi submetida ao processo de remoção do plasma seminal (sêmen lavado – L), por dupla centrifugação (2200 g/10 min), em solução de lavagem (297,59 mM Tris + 105,35 mM Ácido cítrico + 82,58 mM Frutose + 100mL água destilada; pH 6,8) na razão de 1:9 (v/v; sêmen : solução de lavagem). O *pellet* espermático resultante da segunda lavagem foi destinado à diluição. Ao final do processo de diluição oito grupos amostrais estavam constituídos: Tris-NL; Tris-L; TG-NL; TG-L, LS1-NL; LS1-L; LS2-NL; LS2-L (Figura 1).

Após diluição ( $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL), as amostras foram envasadas em palhetas (0,25 mL) e refrigeradas em sistema automatizado (TK-3000<sup>®</sup>, TK Tecnologia em Congelação LTDA, Uberaba, Brasil), utilizando curva de refrigeração lenta (-0,25 °C/min até 5 °C). Após atingir 5 °C (90 minutos), as palhetas foram transferidas para um refrigerador, com temperatura equilibrada (5 °C) e mantidas na posição horizontal para avaliação posterior.

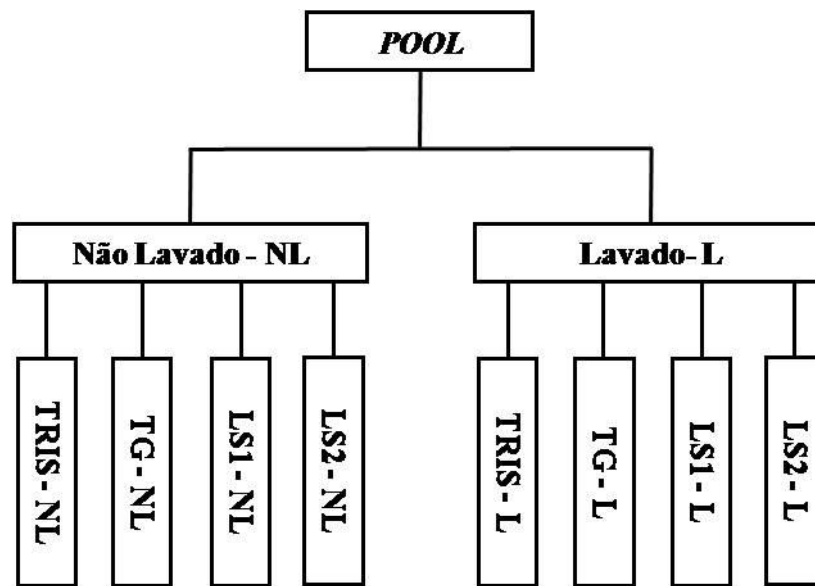


Figura 1. Fluxograma do delineamento experimental desde a obtenção do *pool* à formação dos grupos amostrais.

#### 2.4. Avaliação do sêmen

As avaliações foram realizadas em três momentos distintos: cinco minutos após as amostras atingirem 5 °C (T0), após 24 horas (T24) e 48 horas (T48) de armazenamento (5 °C). Para realização das análises, uma amostra de cada tratamento foi aquecida a 37 °C/30s em banho-maria e então novamente diluída, no próprio diluidor (37 °C), para uma concentração de  $20 \times 10^6$  de espermatozoides/mL. Posteriormente, alíquotas destas amostras foram utilizadas para avaliação da cinética espermática, pelo método do CASA, da integridade de membranas plasmática e acrossomal e do potencial de membrana mitocondrial por meio de microscopia de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Germany).

A avaliação da cinética espermática foi realizada através do sistema computadorizado de análise espermática (CASA, SCA<sup>TM</sup>; Microptics, S.L., Versão 5.1, Barcelona, Espanha). Uma alíquota (5,0 µL) da amostra foi colocada em lâmina pré-aquecida (37 °C), coberta com lamínula e avaliada através da microscopia de contraste de fase (Eclipse 50i, Nikon, Japão) e as imagens capturadas usando uma câmera de vídeo (Basler Vision Technologie<sup>TM</sup> A312FC,

Ahrensburg, Alemanha) com magnificação de 100x. Para cada amostra, cinco campos aleatórios e não consecutivos foram registrados. As seguintes variáveis foram avaliadas: motilidade total (MT; %), motilidade progressiva (MP; %), linearidade (LIN; %), retilinearidade (STR; %), velocidade curvilínea (VCL;  $\mu\text{m/s}$ ) e velocidade em linha reta (VSL;  $\mu\text{m/s}$ ) e velocidade média do percurso (VAP;  $\mu\text{m/s}$ ). Os valores do sistema CASA foram mensurados com as seguintes configurações: temperatura 37 °C; magnificação, 100X; número de imagens, 25; imagens por segundo, 25; área da cabeça, 20 a 70  $\mu\text{m}^2$ ; VAP: lentos 10  $\mu\text{m/s}$  < médios 45  $\mu\text{m/s}$  < rápidos 75  $\mu\text{m/s}$ ; progressividade, 80% STR; circular, 50% LIN.

A integridade de membrana plasmática (iMP) foi avaliada pelo método de dupla coloração utilizando os fluorocromos diacetato de carboxifluoresceína (CFDA; 0,46 mg/mL em DMSO) e iodeto de propídio (PI; 0,5 mg/mL em PBS). Para cada tratamento, uma alíquota (30  $\mu\text{L}$ ) da amostra foi corada com 5,0  $\mu\text{L}$  de CFDA e 5,0  $\mu\text{L}$  PI, incubada por 10 min (25 °C). Um total de 200 espermatozoides foi avaliado usando filtro de excitação DBP 485/20 nm e filtro de emissão de 580-630 nm.

A avaliação da integridade de membrana acrossomal (iAC) foi avaliada utilizando o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína conjugado a *Peanut agglutinin* (FITC-PNA; 100  $\mu\text{g/mL}$  em PBS). Para cada tratamento, uma alíquota (10  $\mu\text{L}$ ) da amostra foi utilizada para confecção de estirado, que, após seco ao ar, foi corado com 20  $\mu\text{L}$  de FITC-PNA e incubado em câmara úmida a 4 °C por 15 minutos, no escuro. Posteriormente, as lâminas foram imersas em PBS, duas vezes, e secas naturalmente. Imediatamente antes da avaliação, 5,0  $\mu\text{L}$  do meio de montagem (4,5 mL de glicerol, 0,5 mL PBS e 5,0 mg de p-fenilediamine) foram colocados na lâmina e coberto com lamínula. Ao todo, 200 espermatozoides por lâmina foram avaliados sob imersão utilizando filtro de emissão LP 515 nm e filtro de excitação BP 450-490 nm.

Para avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PMM) o fluorocromo catiônico lipofílico (JC-1; 0,15 mM em DMSO) foi utilizado. Para cada tratamento, uma

alíquota (30 µL) da amostra foi corada com 5,0 µL de JC-1 e incubada por 10 minutos (25 °C). Ao total, 200 espermatozoides foram avaliados usando filtro de excitação DBP 485/20 nm e filtro de emissão de 580-630 nm.

### 2.5. Análise estatística

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão dos dados não transformados. As variáveis expressas em percentuais foram transformadas pelo método do arco-seno ( $\text{arc seno } \sqrt{P/100}$ ), para posterior procedimento estatístico. Previamente, os dados foram avaliados quanto à normalidade dos dados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados que não atenderam as premissas de normalidade foram submetidos à transformação logarítmica [ $\log(X+1)$ ] ou transformação quadrática [ $RQ(X+1/2)$ ]. Em seguida, os dados submetidos à análise de variância (Teste F), que separou como causa de variação, o efeito de diluidores, tempos e interações (diluidores x tempos). Nos casos em que houve significância no teste F, as médias foram comparadas pelo Teste de Student-Newman-Keuls (SNK) (Sampaio 1998). Os dados foram processados utilizando-se o procedimento GLM (General Linear Model) do Statistical Analysis System (SAS, 2009), como medida repetida no tempo. Para todas as análises estatísticas realizadas foi adotado o nível de significância ( $p$ ) de 5%. O modelo utilizado foi o seguinte:  $Y_{ij} = D + T + DT + E_{ij}$ , onde:  $Y_{ij}$  = valor observado; D = efeito dos diluidores; T = efeito dos tempos; DT = Interação entre diluidores e tempos;  $E_{ij}$  = erro.

## 3. Resultados

Observou-se que a MT média no T0, para as amostras refrigeradas apenas com o tampão base reduziu mais que 70% em relação ao sêmen fresco, demonstrando a ineficiência do diluidor Tris em preservar as células espermáticas durante o período de refrigeração, portanto, os dados referentes ao grupo Tris foram ocultados.

### *3.1. Efeito dos diluidores e da remoção do plasma seminal sobre a cinética espermática*

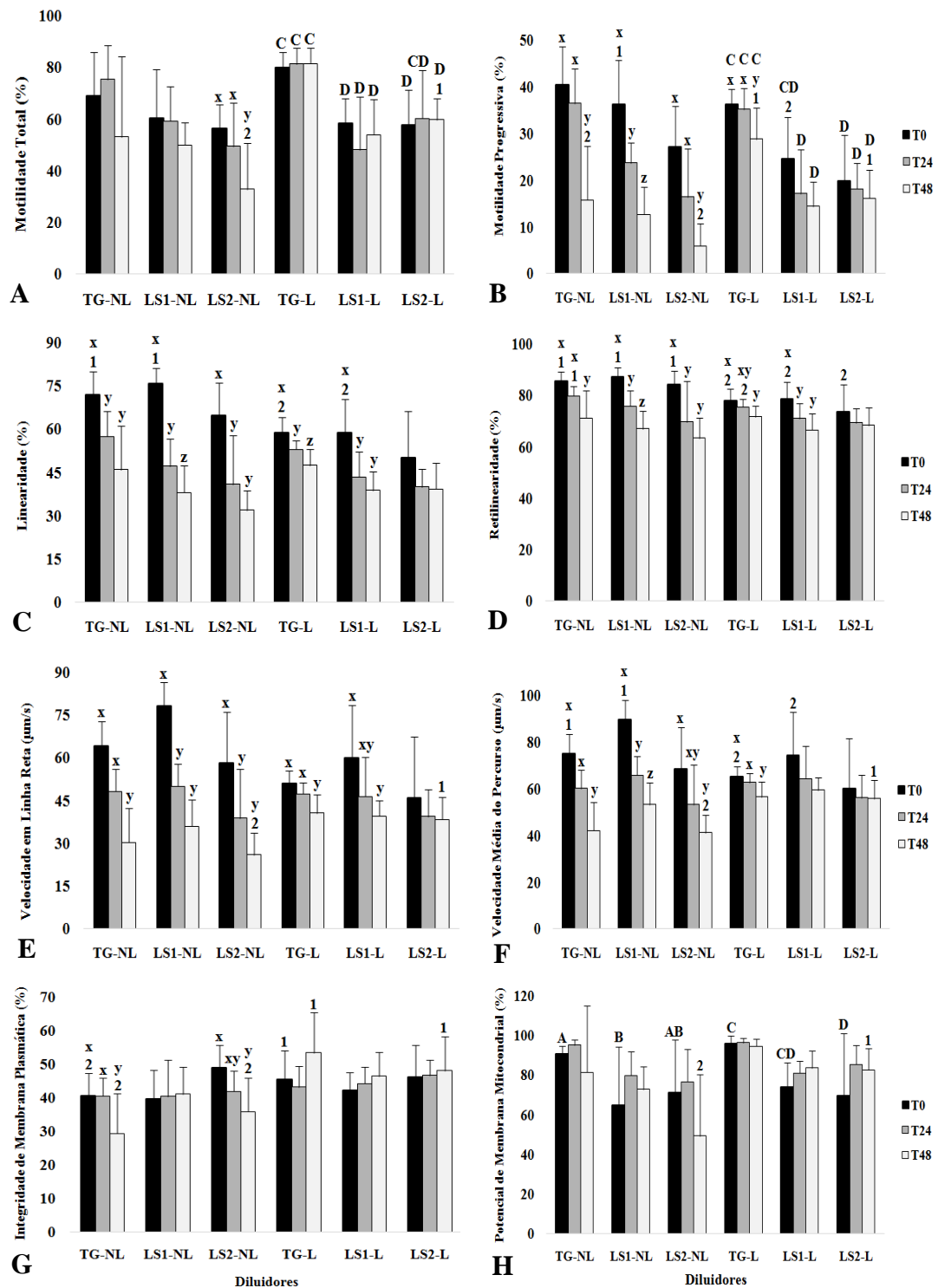
A influência dos diferentes diluidores de refrigeração e da remoção do plasma seminal sobre as variáveis de cinética do sêmen caprino está apresentada na Figura 1 (A-F).

Não foi observada interação diluidor x tempo ( $p>0,05$ ) nas variáveis de cinética espermática obtidas do sêmen não lavado e lavado. Para as amostras de sêmen refrigerado sem remoção do plasma seminal (NL), não foi constatada diferença ( $p>0,05$ ) entre os diluidores para quaisquer das variáveis de cinética avaliadas. No entanto, independente do diluidor utilizado, os valores de MP, LIN, STR, VSL e VAP foram inferiores ( $p>0,05$ ) no T48 em relação ao T0 (Fig. 1 B-F), fato também observado para a MT do grupo SL2-NL (Fig. 1 A).

Após a remoção do plasma seminal, resultados superiores ( $p<0,05$ ) de MT foram obtidos para o grupo TG-L em relação aos grupos LS1-L do T0-T48, e LS2-L no T0 e T48 (Fig. 1 A). A MP também foi superior ( $p<0,05$ ) para o grupo TG-L, quando comparada aos grupos LS1-L nos tempos T24-T48, e LS2-L do T0-T48 (Fig. 1 B).

O tempo de refrigeração não influenciou ( $p>0,05$ ) nas variáveis cinéticas obtidas do grupo LS2-L. Já os valores de MP (Fig. 1 B) e VAP (Fig. 1 F) do grupo TG-L, e de LIN, STR e VSL dos grupos TG-L e LS1-L foram inferiores ( $p<0,05$ ) no T48 em relação ao T0 (Fig. 1 C-E).

Como demonstrado na Figura 1 (A-F), após a remoção do plasma seminal observou-se que no T0 os valores de MP, STR e VAP reduziram ( $p<0,05$ ) após a remoção do plasma seminal. No entanto, observou-se que no T48, os valores de MT, MP, VSL e VAP foram maiores ( $p<0,05$ ) após a remoção do plasma seminal (Fig. 1- A, B, E, F, respectivamente).



**Figura 2.** Influência de diferentes diluidores e da remoção do plasma seminal sobre a integridade do sêmen caprino refrigerado a 5 °C por 48 horas. NL: sêmen não lavado (A, C, E, G); L: sêmen lavado (B, D, F, H); TG: diluidor Tris-gema de ovo; LS1: diluidor Tris-lectina de soja 1%; LS2: diluidor Tris-lectina de soja 2%. A, B: quando presentes, diferentes letras maiúsculas representam diferença ( $p < 0,05$ ) entre diluidores para o sêmen não lavado; C, D: quando presentes, diferentes letras representam diferença ( $p < 0,05$ ) entre diluidores para o sêmen lavado; x, y, z: quando presentes, diferentes letras minúsculas representam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os tempos para o mesmo diluidor; 1, 2: quando presentes, diferentes números representam diferença ( $p < 0,05$ ) entre o sêmen não lavado e lavado para o mesmo diluidor no mesmo tempo.



### *3.2. Efeito dos diluidores e da remoção do plasma seminal sobre a integridade espermática*

A influência dos diferentes diluidores de refrigeração e da remoção do plasma seminal sobre a iMP e o PMM dos espermatozoides caprinos está apresentada nas Figuras 1 G e H, respectivamente.

Não foram observadas interações diluidores x tempo ( $p > 0,05$ ) sobre as variáveis de integridade do sêmen não lavado ou lavado. A iMP do sêmen não lavado não foi influenciada pelo tipo de diluidor ( $p > 0,05$ ), porém nos grupos TG-NL e LS2-NL a iMP foi menor ( $p < 0,05$ ) no T48 em relação ao T0 (Fig. 1 G), fato não observado no grupo LS1-NL. Não houve influência ( $p > 0,05$ ) do diluidor ou do tempo de armazenamento na iMP do sêmen lavado. Entretanto, maior ( $p < 0,05$ ) iMP foi observada no sêmen lavado, quando comparado ao sêmen não lavado, como observado na Fig. 1 G.

Não foram observadas efeito do tipo de diluidor nem do tempo de refrigeração ou da remoção do plasma seminal ( $p > 0,05$ ) sobre a iAC do sêmen não lavado ou lavado.

Observou-se que o PMM sofreu influência apenas do tipo de diluidor no T0, tanto para o sêmen não lavado quanto para o sêmen lavado (Fig. 1 H). Assim, no sêmen não lavado o PMM do grupo TG-NL foi superior ( $p < 0,05$ ) ao do grupo LS1-NL, mas não diferiu ( $p > 0,05$ ) do grupo LS2-NL. No sêmen lavado, o grupo TG-L apresentou maior ( $p < 0,05$ ) PMM que grupo LS2-L, mas não diferiu ( $p > 0,05$ ) do LS1-L. Observou-se ainda maior ( $p < 0,05$ ) PMM para as amostras preservadas em LS2 no T48, após remoção do plasma seminal.

## **4. Discussão**

A refrigeração do sêmen a 5 °C permite prolongar o tempo de vida dos espermatozoides, uma vez que a atividade metabólica destas células é reduzida (Salamon and Maxwell 2000). No entanto, o tempo de armazenamento é fator determinante para a

degradação da qualidade espermática, independente do diluidor, da taxa de diluição e das condições de armazenamento empregadas (O'Hara et al. 2010).

Nas condições do presente estudo, a degradação da qualidade espermática exibiu um comportamento diluidor-dependente, uma vez que ocorreu redução significativa das variáveis avaliadas de forma diferente para cada diluidor ao longo das 48 horas de refrigeração. Além disso, é possível que a interação deletéria entre a Fosfolipase A do plasma seminal do caprino e os fosfolipídios dos diluidores tenham contribuído para o aumento da taxa de degradação do sêmen, como observado por La Falci et al. (2002), fato que poderia explicar a redução ou mesmo a ausência de deterioração significativa ao longo do tempo, para as diversas variáveis observadas após lavagem do sêmen.

De acordo com Coloma et al. (2010), a presença da Fosfolipase A no sêmen caprino está associada à menor resistência à criopreservação. Além disso, na presença de fosfolipídios, esta enzima provoca alterações de membrana plasmática semelhantes aos eventos de capacitação e reação acrossomal, bem como alterações de função mitocondrial com prejuízo à motilidade (La Falci et al. 2002).

A utilização de fosfolipídios de origem vegetal, tais como a lecitina ou fosfatidilcolina de soja, em substituição à gema de ovo e/ou leite nos diluidores de sêmen, tem sido amplamente estudada na espécie caprina (Sariözkan et al. 2010; Roff et al. 2012; Salmani et al. 2013; 2014; Vidal et al. 2013; Chelucci et al. 2015). Contudo, apenas Sariözkan et al. (2010) investigaram a necessidade de remoção do plasma seminal frente à utilização de diluidor à base de lecitina de soja (Bioxcell<sup>®</sup>) e concluíram que o sêmen caprino pode ser congelado no diluidor Bioxcell<sup>®</sup>, com ou sem remoção do plasma seminal. Entretanto, devido aos segredos de patente, a utilização de diluidor comercial não nos permite determinar o nível ótimo de lecitina de soja para criopreservar o sêmen caprino.

Embora não tenhamos detectado diferença significativa entre as concentrações de lecitina de soja utilizadas em nossos diluidores, apenas quando o sêmen caprino foi refrigerado sem remoção do plasma seminal, LS1% foi mais eficiente que a LS2% em preservar a iMP, PMM, MT e MP ao longo das 48 horas de refrigeração. Tem sido observado que o nível ótimo de lecitina de soja para criopreservação do sêmen caprino deve ser inferior a 2%, seja na presença (0,08%, Vidal et al. 2013; 1,5%, Salmani et al. 2014) ou na ausência (1,0%, Chelucci et al. 2015) de plasma seminal. Portanto, é sugerido que elevadas concentrações de lecitina de soja sejam tóxicas à viabilidade espermática (Forouzanfar et al. 2010; Vidal et al. 2013).

Diferente da congelação, a refrigeração não cessa o metabolismo seminal. Assim, é possível que a lecitina de soja em concentrações a partir de 2% apresente maior quantidade de substratos susceptíveis à degradação pela Fosfolipase A presente no plasma seminal do caprino, com conseqüente acúmulo de substâncias tóxicas aos espermatozoides, o que poderia explicar a melhor eficiência do diluidor LS2% após remoção do plasma seminal.

A membrana plasmática do espermatozoide é a primeira estrutura a sofrer os danos decorrentes do processo de criopreservação (Watson 1995) e esses danos podem ser minimizados pela adição de fontes lipídicas aos diluidores de sêmen (Salamon and Maxwell 2000). No presente estudo, diferentes crioprotetores não penetrantes (TG, LS1 e LS2) foram testados e, de maneira geral, não foram observadas diferenças entre os grupos quanto à capacidade de preservar a iMP após dois dias de refrigeração

Ricker et al. (2006) demonstraram que os fosfolipídios da lecitina de soja não penetram na membrana espermática, mas aderem-se firmemente a esta estrutura formando uma barreira física contra os danos da criopreservação. Outros mecanismos propostos são que a lecitina de soja substitui os fosfolipídios da membrana espermática perdidos durante a

criopreservação ou que interage com partículas deletérias do plasma seminal de maneira semelhante às lipoproteínas de baixa densidade (Zhang et al. 2009).

A integridade de membrana acrossomal não foi influenciada pela composição do diluidor ou pelo tempo de refrigeração, tampouco pela remoção do plasma seminal. Sariözkan et al. (2010) observaram efeito benéfico da remoção do plasma seminal sobre a iAC quando o sêmen de caprino foi congelado com Bioxcell<sup>®</sup>, em comparação ao diluidor Tris-gema. Nenhuma influência do tipo de diluidor (leite, Tris-gema e Bioxcell<sup>®</sup>) sobre a iAC foi observada para o sêmen refrigerado de búfalos. Porém, deterioração gradativa desta organela ocorreu ao longo de cinco dias de refrigeração (Akther et al. 2011).

Vidal et al. (2013) não observaram diferenças na iAC pós-descongelamento do sêmen caprino diluído em leite desnatado ou lecitina de soja. Embora não tenhamos evidenciado diferenças entre diluidores, estudos ultraestruturais têm demonstrado que a criopreservação em meio à base de gema de ovo provoca destruição ou reação acrossomal (Amirat et al. 2005), que podem implicar na aglutinação espermática e dificultar a avaliação do sêmen, fato não observado quando diluidor à base de lecitina de soja (Andromed<sup>®</sup>) foi utilizado (Aires et al. 2003).

Nossos resultados demonstram que na presença de plasma seminal o grupo LS1 preservou a cinética espermática igualmente ao grupo TG. No entanto, apesar do observado efeito positivo da remoção do plasma seminal sobre as variáveis avaliadas, nossos resultados demonstram que os grupos LS1 e LS2 apresentaram menor capacidade de manutenção da cinética espermática do que os diluidores de origem animal, no sêmen lavado. Apesar dos dados disponíveis na literatura demonstrarem efeito positivo da lecitina de soja sobre a cinética espermática, tanto para o sêmen não lavado (Sariözkan et al. 2010; Roof et al. 2012; Vidal et al. 2013; Salmani et al. 2014) quanto para o sêmen lavado (Chelucci et al. 2015).

Com base no exposto, pode-se concluir que a lecitina de soja na concentração de 1% apresenta-se como uma alternativa viável à gema de ovo para a refrigeração do sêmen caprino durante 48 horas a 5 °C e que a remoção do plasma seminal melhora a conservação do sêmen caprino refrigerado.

## Referências

- Aires VA, Hinsch K-D, Mueller-Schloesser F, Bogner K, Mueller-Schloesser F, Hinsch E, 2003. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology* **60**, 269-279.
- Akhter S, Ansari MS, Rakha BA, Ullah N, Andrabi SMH, Khalid M, 2011. In vitro evaluation of liquid-stored buffalo semen at 5 °C diluted in soybean lecithin based extender (Bioxcell®), tris-citric egg yolk, skim milk and egg yolk-citrate extenders. *Reprod Dom Anim* **46**, 45-49.
- Bousseau S, Brillard JP, Marquant-Le Guinne B, Guérin B, Camus A, Lechat M, 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology* **50**, 699-706.
- Chelucci S, Pasciu V, Succu S, Addis D, Leoni GG, Manca ME, Naitana S, Berlinguer F, 2015. Soybean lecithin-based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. *Theriogenology* (*in press*).
- Coloma MA, Toledano-Díaz A, López-Sebastián A, Santiago-Moreno J, 2010. The influence of washing Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) sperm on the effects of cryopreservation in dependency of the photoperiod. *Theriogenology* **73**, 900-908.
- Crespilho AM, Sá Filho MF, Dell'Aqua Jr JA, Nichi M, Monteiro GA, Avanzi BR, Martins A, Papa FO, 2012. Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or new lecithin based extenders. *Livest Sci* **149**, 1-6.

- De Paz P, Estes MC, Alvarez M, Mata M, Chamorro CA, Anel L, 2010. Development of extender based on soybean lecithin for its application in liquid ram semen. *Theriogenology* **74**, 663-671.
- Forouzanfar M, Shafari M, Hosseini SM, Ostadhosseini S, Hajian M, Hosseini L, Abedi P, Nili N, Rahmani HR, Nasr-Esfahani MH, 2010. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology* **73**, 480-487.
- Kasimanickam R, Kasimanickam V, Tibary A, Pelzer K, 2011. Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4°C. *Small Rumin Res* **99**, 208-213.
- La Falci VSN, Tortorella H, Rodrigues JL, Brandelli A, 2002. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. *Theriogenology* **57**, 1035-1048.
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S, 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci* **62**, 113-141.
- Morris LHA, 2005. Challenges facing sex preselection of stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci* **89**, 147-157.
- Mozafari MR, 2010. Nanoliposomes: preparation and analysis. *Methods in Mol Biol.* **605**, 29-50.
- O'Hara L, Hanrahan JP, Richardson L, Donovan A, Fair S, Evans ACO, Lonergan P, 2010. Effect of storage duration, storage temperature, and diluente on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology* **73**, 541-549.
- Phutikanit N, Sangkrachang E, Suwimonteerabutr J, Singlor J, 2011. Effect of sources and concentrations of soybean phosphatidylcholine on diluted goat semen equilibrated at 4°C. *J. Agr. Sci. Tech. A* **1**, 1170-1173.
- Purdy PH, 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rumin Res* **63**, 215-225.

- Ricker JV, Linfor JJ, Delfino WJ, Kysar P, Scholtz EL, Tablin F, Crowe JH, Ball BA, Meyers SA, 2006. Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. *Biol Reprod* **74**, 359-365.
- Roof DJ, Bowley S, Price LL, Matsas DJ, 2012. Comparison of two comercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. *Theriogenology* **77**, 412-420.
- Salamon S, Maxwell WMC, 2000. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* **62**, 77-111.
- Salmani H, Nabi MM, Vaseghi-Dodaran H, Rahman MB, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Shakeri M, Towhidi A, Shahneh AZ, Zhandi M, 2013. Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freezing-thawing. *Small Rumin Res* **112**, 123-127.
- Salmani H, Towhidi A, Zhandi M, Bareini M, Shafari M, 2014. In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. *Cryobiology* **68**, 276-280.
- Sampaio IBM, 1998. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. 221p.
- Sariözkan S, Bucak MN, Tuncer PB, Taşdemir U, Kinet H, Ulutaş PA, 2010. Effect of different extenders and centrifugation/washing on postthaw microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of Angora buck sperm. *Theriogenology* **73**, 316-323.
- Statistical Analyses Sistem Institute. Inc 2009. SAS user's guide: Statistics Version, 2009. SAS, Cary, N. C.
- Vidal AH, Batista AM, Silva ECB, Gomes WA, Pelinca MA, Silva SV, Guerra MMP, 2013. Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation. *Small Rumin Res* **109**, 47-51.
- Vishwanath R, Shannon P, 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Theriogenology* **62**, 23-53.

Watson PF, 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* **7**, 871-891.

Yoshida M, 2000. Conservation of sperms: current status and new trends. *Anim Reprod Sci* **60-61**, 349-355.

Zhang S-S, Hu J-H, Li Q-W, Jiang Z-L, Zhang X-Y, 2009. *Afr J Biotechnol* **8** (22), 6476-6480.



## **ANEXO – Orientações para autores – Reproduction in Domestic Animals**

Edited By: H. Rodriguez-Martinez

Impact Factor: 1.177

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2013: 15/52 (Agriculture Dairy & Animal Science);  
26/30 (Reproductive Biology); 47/132 (Veterinary Sciences)

Online ISSN:

### **Author Guidelines**

#### **1. General**

Reproduction in Domestic Animals is an international journal publishing original, significant articles on reproduction in domestic animals, laboratory animals, and wildlife, with particular attention to basic, applied and clinical research. Reproduction is considered in a broad context, with its strong disciplinary, comparative core. The journal therefore covers obstetrics, neonatology and udder health, and welcomes contributions in these areas. The scope of the journal applies to veterinarians, breeders, and biologists while also being of interest to practitioners of human medicine. Reproduction in Domestic Animals is the official organ of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR), the European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR), and the Spanish Society of Animal Reproduction (AERA).

We encourage the submission of topical results for publication as original papers, reviews (mini-reviews or critical feature articles), or short communications (including case reports and technical notes). Note that Reproduction in Domestic Animals only publishes well-written papers of high scientific quality and significance for the advancement of the field of reproduction, despite they being scientifically sound or properly executed or written. Feature articles or reviews should overview known information or tackle controversial issues in a particular area of the above-mentioned fields that comprise the scope of the journal, with the aim of founding future innovative research. Letters to the Editor, viewpoint articles and

comments on published papers are also welcomed. Comments should be confined to the substance of the paper and the authors of the paper referred to will be offered the opportunity to respond. The journal publishes ONLINE-only preliminary communications of results that are of current and extreme interest. Authors interested in preparing a review, a feature article, or a viewpoint article, are invited to discuss the matter with the Editor-in-Chief. Such preliminary contact with the Editor-in-Chief is also advisable when Patent-related matters are included in any manuscript. All papers are subjected to a thorough peer-review by at least two ad-hoc peer referees. Short communications will be subject to accelerated, but very strict refereeing. The publication language is English.

Short communications will be subject to accelerated, but very strict refereeing. Short Communications are available online only under its respective volume and issue at [www.wileyonlinelibrary.com/journal/rda](http://www.wileyonlinelibrary.com/journal/rda). The quality of articles and the standards for publication remain the same whether papers are published both print and online, or online-only.

The publication language is English.

English Language Editing Service: Ensure your paper is clearly written in standard, scientific English language appropriate to your discipline. Visit our site to learn about the options. Please note that using the Wiley English Language Editing Service does not guarantee that your paper will be accepted by this journal.

## 2. Manuscript submission

The submission and review process of *Reproduction in Domestic Animals* is solely handled online at <http://mc.manuscriptcentral.com/rda>. To submit an article to *Reproduction in Domestic Animals*, please go to <http://mc.manuscriptcentral.com/rda>, create an account and submit your article. Complete instructions on how to submit a paper are available online at the Journal website [wileyonlinelibrary.com/journal/rda](http://wileyonlinelibrary.com/journal/rda). Please note that it is compulsory to include include all authors with their affiliation and valid email addresses.

Please see that the corresponding author's complete address and a valid email are also present in the manuscript.

## 2.1. Licence to publish

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

### For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below

CTA Terms and Conditions [http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-\\_301.html](http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-_301.html)

### For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreement (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services [http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-\\_301.html](http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-_301.html) and visit

<http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by certain funders [e.g. The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) or the Australian Science Fund (FWF) ] you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

## 2.2. Authorship and Acknowledgements

**Authorship:** Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript has been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal.

Reproduction in Domestic Animals adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE, authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

Upon submission of the manuscript, it is required that all authors be accredited as appropriate. During the online submission process, the corresponding author will be asked to submit a short description of each individual's contribution to the research and its publication. Upon submission of a manuscript all co-authors must also be registered with correct e-mail addresses. If any of the e-mail addresses supplied are missing or incorrect, the manuscript shall not be processed pending contact with the corresponding author.

**Acknowledgements:** Authors must acknowledge individuals who do not qualify as authors but who contributed to the research presented. Authors must acknowledge any assistance that they have received (e.g. provision of writing assistance, literature searching, data analysis, administrative support, supply of materials), describing if and how this assistance was funded and included with other funding information. The acknowledgements should be brief and not include thanks to anonymous referees and editors. Where scientists are acknowledged, a covering letter demonstrating their consent must be provided.

**Conflict of interest:** A subheading "Conflict of interest statement" must be placed at the end of the manuscript text (following acknowledgements), where all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately bias or influence their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, or direct or indirect funding.

**Funding sources:** All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript;

and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should state this clearly.

Use of non-commercially available instrumentation, substances, antibodies or assays: When these had been kindly provided by any research group or company, an appropriate letter from them **MUST** be provided alongside the manuscript at submission (upload it as a well identified supplementary file).

### 3. Manuscript Requirements

#### 3.1. Format

The manuscript must be typed (Times, font 12) with double spacing throughout and with a margin of at least 3 cm on the left-hand side. Lines must be numbered in a consecutive manner starting on the first page, in the left-hand margin. All pages of the manuscript must also be numbered consecutively, including those containing references, tables, and captions to illustrations, all of which are to be placed after the text. Illustrations, both line drawings and photographs, are to be numbered as figures in a common sequence. The text should be prepared using standard software (Microsoft Word),.doc; do not use automated or manual hyphenation.

On page one of the manuscript the official name of the institution, the place where the work was carried out, the title of the article, and the names of authors must be stated as follows: Town, Country (no mailing address); Title of Article; Name A, Name B, and Name C. The title should be concise and appropriately informative and should contain all keywords necessary to facilitate retrieval by modern search techniques. Additional keywords not already contained in the title or contents (abstract, summary) may be listed beneath the contents. An abridged title suitable for use as a running head at the top of the printed page and not exceeding 50 letters and spaces should also be supplied. Each original paper, review or short communication shall contain a short contents (abstract, summary), preferably less than 250 words. The contents should not just recapitulate the results but should state concisely the scope of the work and give the principal findings, avoiding acronyms and references. The contents shall be complete enough for direct use by abstracting services.

Original articles should be structured in the following order: Title, Contents, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgment and References. Placement of figures and tables should be indicated in the text. The experimental design should be described in sufficient detail (methods, analyses, statistics, breeds, origin, and management of animals etc.) to allow for repetition of the experiments.

If the paper is one of a numbered series, a reference to the previous part should be given as a footnote on the first page. If a part not yet published needs to be consulted for a proper understanding of the paper, an electronic copy of that manuscript should be supplied to assist the referees. The corresponding author postal and a functional e-mail address must appear at the end of the paper. Sets of identical data should not be given in tables and figures. Figures and tables should be accompanied by a legend.

The manuscript comprises a printout of the text, figures, tables, and a list of all figures and tables with their captions and titles on a separate piece of paper. We ask that you convey the essential information within the first 60 characters of the captions to accommodate the online edition. Each figure, table, and bibliographic entry must have a reference in the text. For all figures please include reproduceable artwork (marked with the author's name, short title, and figure number). Please do not import the figures into the text file.

### 3.2. Length

Original papers and review articles, including figures, tables and references, should not exceed 5,000 words. Short Communications (case reports and technical notes), should not exceed 1,800 words, including figures, tables and references. The number of figures and tables should be kept to a minimum. Extended data sets can be published online as supplementary material and should be identified as such.

### 3.3. Units, abbreviations and nomenclature

All specifications must be stated according to the S.I. System. Concentrations of chemical solutions are to be given in mol/l. All other concentrations should be given in % (volume or weight). All products implemented are to be mentioned with the manufacturer's name and delivery address which should appear in a footnote on the same page.

Any abbreviations of chemical, biological, medical, or other terms should only be employed when it is certain that they are internationally known. The full name must be stated in brackets when the abbreviation is first used.

All biological, medical, chemical, or other terms should be used according to the most recent recommendations of respective international nomenclature. Enzymes should be given according to the Enzyme Nomenclature (Elsevier Publishing Co., 1965). In the case of commercially obtained substances or reagents, the name and address of the manufacturer or supplier should be given as a footnote, when they are first mentioned in the text. Products (preparations etc.) with a registered trademark should be marked with ®. When non-commercially available substances or reagents are used, the following text must be provided: “[kindly provided by (name of the person plus the research group address or company name and location) and the corresponding date]”

Bacterial names should be in accordance with the latest edition of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (The Williams and Wilkins Co., Baltimore). Viruses are to be given the classification and names recommended by the International Committee on the Nomenclature of Viruses.

#### 3.4. Illustrations and tables

Original Photographs or drawings must be sharp and of high contrast. Figures should be saved in a neutral data format such as TIFF or EPS, and a printout should always be included. Powerpoint and Word graphics are unsuitable for good quality reproduction. Please do not use any pixel-oriented programmes. Scanned figures (only in TIFF format) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size. Please note that figures will generally be reduced to fit within the column-width or the print area. This means that numbering and lettering must still be readable when reduced (e.g. maps) and that the scale might not correspond with the original (microscopic pictures), thereby invalidating references to scale in the text. If artwork is to be scanned, line drawings should only be contour drawings without halftones (shades of grey). Please do not use patterns; rough hatching is possible. Graphs with an x and y axis should not be enclosed in frames; only 2-dimensional representations. Do not forget the labels and units. Captions for the figures should give a precise description of the content and should not be repeated within the figure.

Please submit the data for figures in black and white. However, colour photos can be reproduced in black and white (with a possible loss of contrast). Colour graphics should be created using the RGB mode. There is a charge for alterations to figures when carried out by the publisher. Figures printed in colour are subject to an added charge. In the event that an author is not able to cover the costs of reproducing colour figures our figures in colour in the printed version of the journal, *Reproduction in Domestic Animals* offers authors the opportunity to reproduce colour figures in colour for free in the online version of the article (but they will still appear in black and white in the print version). If an author wishes to take advantage of this free colour-on-the-web service, they should liaise with the Editorial Office to ensure that the appropriate documentation is completed for the Publisher. Colour print charges are explained on the Colour Work Agreement Form. Once completed, please return the form to:

Customer Services (OPI)  
John Wiley & Sons Ltd, European Distribution Centre  
New Era Estate  
Oldlands Way  
Bognor Regis  
West Sussex  
PO22 9NQ

Scanned or faxed copies will not be accepted. Please direct queries to the Production Editor at [rda@wiley.com](mailto:rda@wiley.com).

Tables should be created using the table function.

### 3.5. References

In the text, citations are listed chronologically by the author and date and are not numbered. All citations in the text must be listed at the end of the paper, according to the guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors established in 1979. References should be listed in alphabetical order of the first author's name and all the authors should be listed.



The following are examples of the styles required for citing a book chapter, a journal article, and an entire book. For conference proceedings, be sure to include the name(s) of the editor(s) of the proceedings, the publisher and the place of publication.

Ewald C, Apel G, von Mickwitz G, 1988: Erfahrungen mit der Vakzination gegen die Haemophilus-Pleuropneumanie der Stewing. Berl Münch Tierärztl Wschr 102, 6-11.

Mair A, Diebschlag W, Distl O, Kräußlich W, 1988: Analysis of pressure distribution on the foot soles of cattle. J Vet Med A 35, 696-704.

Niemann H, Elsaesser F, 1983: Steroid hormones in early pig embryo development. In: Bavister BD (ed), The Mammalian preimplantation Embryo. Plenum Press New York, pp. 117-132.

Citations in the text should be given by placing in parenthesis the name(s) of author(s) and the year of publication, e.g. (Thein and Härtl 1986), (Ewald et al. 1988), (Mair et al. 1988; Nieman and Elsaesser 1983).

All entries in the reference list must correspond to citations in the text. No editorial responsibility can be taken for the accuracy of the references, and authors are requested to check these with special care. Papers that have not been accepted for publication are not to be included in the list of references and must be cited either as 'unpublished data' or as 'personal communication'. The use of such citations is discouraged. It is the author's responsibility to ensure that they have permission to cite material as a personal communication.

### 3.6. Laboratory animals

Papers reporting work with animals should include a reference to the code of practice adopted for the experimentation. Editors will take account of ethical and animal welfare issues and reserve the right not to publish.

#### 4. Proof correction and offprints

When you receive proofs of your article, please check, correct, and return them electronically to the Editor-in-Chief without delay (within 3 days of receipt), as e-annotated proofs. As changes to proofs are costly, we ask that you only correct typesetting errors.

Proofs will be sent via e-mail as an Acrobat PDF (portable document format) file. The e-mail server must be able to accept attachments up to 4 MB in size. To view, print and annotate the proofs of your article you will need Adobe Reader version 7 (or higher). This software can be downloaded (free of charge) for a whole series of platforms that include PC, Mac, and UNIX and can be downloaded from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. Further instructions will be sent with the proof. In your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs.

Free access to the final PDF offprint of your article will be available via author services only. Please therefore sign up for author services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers.

#### 5. Book reviews

Book reviews appear irregularly at the end of the journals. Books submitted for review are sent by the editors to a scientist involved in the special research area. No fee is paid for reviews, but the review copy of the book (either as hard copy or electronic copy) remains the property of the reviewer. Each review should begin with exact bibliographical data on the publication, according to the following pattern:

Author(s) and/or editor(s), publication title, subtitle, edition, title of the publication series (and possibly its editors) in which the book has appeared, publisher, place of publication, year of publication, number of pages, number of illustrations, tables, and diagrams, cover material (e.g. paperback, quarter cloth binding etc.), retail price. Example:

Immelmann, F.: Introduction to Animal Behaviour. Revised and extended 3rd edition. Pareys Studentexte No. 13. Paul Parey Scientific Publishers, Berlin and Hamburg. 1983. 223 pp., 106 figs., Balacron paperback, Euro 28.0.

## 6. Supplements

As the official organ of the ESDAR, the EVSSAR and AERA, the journal publishes the proceedings (fully refereed main papers and abstracts) of the societies' Annual Meetings. Other Proceedings, as hard copy and/or online, can be published as Supplements following agreement with the Editor-in-Chief (for contents and scope) and the publisher (for terms and cost).

Wiley Blackwell's Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Reproduction in Domestic Animals is covered by Wiley Online Library's Early View online service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.