

Abanico Veterinario. Janeiro-Dezembro 2021; 11:1-12. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2021.8>  
Artigo Original. Recebido: 31/08/2020. Aceito: 20/01/2021. Publicado: 06/02/2021. Chave:2020-75.

## Determinação da qualidade do sêmen criopreservado com lecitina de soja ou gema de ovo, em caprinos

Determination of the quality of semen cryopreserved with soy lecithin or egg yolk, in male goats

Moreno-Avalos Silvestre<sup>1</sup> ID, Veliz-Deras Francisco<sup>2</sup> ID, Calderon-Leyva Guadalupe<sup>1</sup> ID, Contreras-Villarreal Viridiana<sup>2</sup> ID, Guillen-Muñoz Juan<sup>2</sup> ID, Angel-García Oscar<sup>\* 2</sup> ID

<sup>1</sup>Departamento de Producción Animal, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Torreón, Coahuila, México. <sup>2</sup>Departamento de Ciencias Médico Veterinarias, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Torreón, Coahuila, México. \*Autor responsável e de correspondência: Ángel-García Oscar. Periférico y Carretera a Santa Fé SN, Colonia Valle Verde, Torreón, Coahuila, México, CP 27052. Correo. angelgarciao@hotmail.com, velizderas@gmail.com, gcalderon06@hotmail.com, dra.viridianac@gmail.com, mvz\_guillen@hotmail.com

### RESUMO

O objetivo foi comparar a qualidade do sêmen caprino criopreservado com diferentes tratamentos à base de lecitina de soja ou gema de ovo. O sêmen foi coletado de cabras da raça Alpina (n = 4), foram utilizados dois diluentes comerciais: AndroMed® (1% de lecitina de soja, LS); Optidyl® com 20% (v/v) Tris-gema de ovo; TY), e um terceiro diluente à base de citrato-gema de ovo (CY), em sêmen fresco (SF) e em seguida resfriado de 37 a 4 ° C por 2 h; sêmen resfriado (SR), em seguida, as palhetas foram preenchidas com sêmen e congeladas em nitrogênio líquido a -196 °C (SC). Não houve diferença (p > 0,05) entre os diluentes do SF em relação à motilidade da massa (MM; 4,7 ± 0,26), viabilidade espermática (VE; 74,1 ± 1,66) e motilidade individual (MI; 62,3 ± 4,0). Da mesma forma, para o RS não houve diferença (p > 0,05) entre os diluentes em relação ao MM = 3,83 ± 0,4 e MI = 52,1 ± 6,0, porém o VE variou (p < 0,05) de acordo com o diluente, observando a menor viabilidade em LS vs. CY e TY (51,0 ± 13,0 vs 71,3 ± 3,0 e 69,0 ± 3,1). Em relação ao SC, MM, MI e VE favoreceu (p < 0,05) o diluente TY vs. LS e CY (2,4 ± 0,5, 32,5 ± 8,3, 41,3 ± 13,0). Os resultados mostraram uma melhor criopreservação do sêmen caprino com o diluente Tris-gema em comparação com a lecitina de soja.

**Palavras-chave:** Lecitina de soja, diluente, sêmen de cabra

### ABSTRACT

The objective was to compare the quality of cryopreserved goat semen with soy lecithin or egg yolk. The semen was collected from male goats (n=4), two commercial diluents AndroMed® (1% soy lecithin, SL); Optidyl® (20% (v/v) Tris-egg yolk; TY), and a citrate-egg yolk-based diluent (CY) were used in fresh semen (FS) and then cooled from 37 to 4 °C for 2 h (refrigerated semen, RS), afterwards straws were filled with semen and frozen in liquid nitrogen at -196 °C (FS). There were no differences (p>0.05) between diluents in the SF in the mass motility (MM; 4.7±0.26), sperm viability (SV; 74.1±1.66) and individual motility (MI; 62.3±4.0). In the same sense, for the SR there was no difference (p>0.05) between diluents with respect to MM (3.83±0.4) and MI (52.1±6.0), however, the SV varied (p<0.05) according to the diluent, observing the lowest viability in SL vs CY and TY (51.0±13.0 vs 71.3±3.0 and 69.0±3.1). Regarding SC the MM, MI and SV obtained better values (p<0.05) with the diluent TY vs SL and CY (2.4±0.5, 32.5±8.3, 41.3±13.0). The results showed a better cryopreservation of goat semen with the diluent Tris-yolk compared to that of soy lecithin.

**Keywords:** Soy lecithin, diluent, goat semen

## INTRODUÇÃO

Os diluentes tradicionais que são adicionados ao sêmen para a preservação da viabilidade e fertilidade do esperma durante a criopreservação incluem gema de ovo (Lima-Verde *et al.*, 2017). Isso se deve ao fato de que a gema de ovo protege os espermatozoides dos danos induzidos pela criopreservação durante o resfriamento, congelamento e descongelamento, interagindo diretamente com a membrana plasmática (Andrabi *et al.*, 2008; Akçay *et al.*, 2012; Sieme *et al.*, 2016). Porém, nos últimos anos, tem havido opinião frequente contra o uso de gema de ovo devido à grande variabilidade de seus componentes, o que torna complexa a avaliação de seus benefícios (Kulaksız *et al.*, 2010). Além disso, buscou-se evitar o uso de diluentes de origem animal, uma vez que poderiam ser uma possível via de transmissão da doença (Lima-Verde *et al.*, 2017; Ansari *et al.*, 2017).

Em relação à gema de ovo, alguns componentes indesejáveis (hormônios esteróides e suas moléculas precursoras) são considerados prejudiciais à integridade do esperma (Akhter *et al.*, 2012; Lima-Verde *et al.*, 2017). O principal componente da gema de ovo que protege a membrana do esperma é a lipoproteína de baixa densidade (LDL). Foi demonstrado que os fosfolipídios ou lecitina na gema do ovo tornam os espermatozoides menos sensíveis ao resfriamento (Zeron *et al.*, 2002). Em particular, no cabrito macho, existem interações negativas entre os fosfolipídios da gema do ovo e a glândula bulbouretral, esta glândula secreta com o plasma seminal uma enzima coagulante da gema do ovo, que catalisa a hidrólise da lecitina da gema em ácidos graxos e liolecitina, que são citotóxicos (Ngoma *et al.*, 2016). Portanto, substitutos quimicamente definidos para a gema de ovo têm sido usados sem serem de origem animal (El-Sisy *et al.*, 2018; Gamal *et al.*, 2016), feitos de lecitina de soja e que podem ser potenciais alternativos para a criopreservação de sêmen (Akhter *et al.*, 2012).

Acredita-se que os lipossomas atuem de forma semelhante às lecitinas na gema do ovo ou no leite (Belala *et al.*, 2016). Em búfalos, não foram encontradas diferenças em termos de integridade acrossomal quando diluentes à base de gema de ovo, lecitina ou lipossomas de soja foram usados (Kumar *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2013). Nesse contexto, os diluentes à base de gema de ovo merecem atenção especial quanto aos seus componentes e ao seu efeito em relação aos diluentes à base de lipossomas. Devido ao fato de que o efeito dos componentes acima mencionados é pouco conhecido sobre a qualidade do sêmen criopreservado em caprinos machos, nos propusemos como objetivo comparar os efeitos de diluentes à base de lecitina de soja ou gema de ovo sobre a qualidade do sêmen conservado por refrigeração e congelamento.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Geral**

Todos os métodos e manejo das unidades experimentais utilizadas neste estudo estavam em estrita conformidade com as diretrizes para o uso ético, cuidado e bem-estar de animais em pesquisa em nível internacional (FASS, 2010) e nacional (NAM, 2002) número UAAAN-UL referência de aprovação institucional com código 38111-425501002-2431.

### **Localização e animais**

O experimento foi realizado no norte do México, no Centro Caprino da Universidade Agrária Autônoma Antonio Narro (26° Latitude Norte e 104° Longitude Oeste), durante a estação reprodutiva (janeiro). A área de estudo está a uma altitude de 1120 metros acima do nível do mar, com precipitação média anual de 230 mm e temperatura média de 24° C, máxima de 41 °C em maio e junho e mínima de -1 °C em dezembro e janeiro. (CONAGUA, 2015). Foram utilizados caprinos machos adultos da raça Alpino-Francesa (n = 4, 1,5 a 2 anos), homogêneos quanto ao peso vivo (PV; 75,0 ± 0,32 kg) e condição corporal (CC; 3,5 ± 0,10 unidades) com fertilidade comprovada antes do estudo experimental através de avaliações frequentes da qualidade seminal. Durante o período experimental, os machos foram alimentados duas vezes ao dia (800 h e 1800 h), com acesso livre, com dieta à base de feno de alfafa (18% PB, 1,95 Mcal de EM) e 100 g de concentrado comercial (21% PC, 1,7 Mcal ME) com base em suas necessidades nutricionais (NRC, 2007). Os machos tiveram livre acesso a água limpa e sais minerais e um período de adaptação de 2 semanas antes da investigação.

### **Coleta e processamento de sêmen**

O sêmen foi coletado pela manhã (800 a 1000 h) a cada 3 dias, durante três semanas, uma fêmea em atividade estral foi utilizada como estímulo para a extração do sêmen. O sêmen foi coletado em vagina artificial padrão para ovinos e caprinos, mantida a uma temperatura de 38 °C, portanto, foi pré-aquecida a 42 °C antes da coleta. Foram coletados 24 ejaculados, após cada extração o sêmen foi imediatamente imerso em banho-maria a 37 °C para posterior análise macroscópica e microscópica durante os 10 minutos seguintes.

### **Preparação de diluentes e processo de congelamento**

Dum total de 24 ejaculados (6 ejaculados por homem) e cada ejaculado foi dividido em três alíquotas de partes iguais para serem processadas para criopreservação, usando dois diluentes comerciais: AndroMed® (Minitübe, Tiefenbach, Alemanha; com 1% de lecitina de soja; **LS**); Optidyl® (CRYO-VET, França; com 20% (v/v) de Tris-gema de ovo; **TY**), e um terceiro diluente à base de citrato-gema de ovo (**CY**) obtido de acordo com a técnica usada por Salamon o Maxwell, (2000) .

No experimento, foram consideradas apenas amostras com volume > 0,5 mL, concentração de  $2,5 \times 10^9$  mL, motilidade de massa  $\geq 3,0$  e viabilidade  $\geq 70\%$ . Posteriormente, as amostras já diluídas foram submetidas a 3 processos de avaliação: sêmen fresco (SF); sêmen resfriado (SR, equilibrado a 4 °C por 2 horas); e sêmen congelado (SC). Após a refrigeração do sêmen, os canudos de 0,25 mL foram preenchidos e para o processo de congelamento foram colocados em 7 cm de nitrogênio líquido (NL, -140 °C) por 10 min; em seguida, foram submersos diretamente no NL (-196 °C) e armazenados até a análise (Jerez *et al.*, 2016). Em cada um dos estados de conservação (SF, SR e SC), o sêmen foi analisado, imediatamente e a cada 15 minutos durante o processo de conservação, para avaliação da massa e motilidade e viabilidade individual. No caso do SC, foi analisado 24 horas depois, para o qual a palha foi descongelada, imergindo-a em água temperada (37° C) por 30 s.

### **Variáveis avaliadas**

A *motilidade da massa* (MM;% ) foi avaliada com a utilização de plataforma pré-aquecida (37 °C), colocando-se uma gota de sêmen puro (20 µl) em lâmina de microscópio óptico com objetiva de 10x, e de acordo com o observado movimento, uma pontuação de escala arbitrária de 1 a 5 foi atribuída, onde 1 = 25% e 5 = 100% espermatozoides móveis (Mahsud *et al.*, 2013). A *motilidade individual* (IM;% ) foi determinada a partir da proporção de espermatozoides progressivamente móveis, para isso, uma gota (10µL) de sêmen foi colocada em uma lâmina e coberta com uma lâmina de lamínula; posteriormente, foi observado ao microscópio com objetiva de 40x. A viabilidade espermática (VE;% ), foi avaliada pela técnica de coloração com eosina-nigrosina (Kafi *et al.*, 2004), pelo menos 200 espermatozoides por amostra foram observados em microscópio de luz, usando a objetiva de 100X, e a porcentagem de células vivas (não coradas) e células mortas (coradas em rosa) foram calculadas. Todas as avaliações foram realizadas sempre pelo mesmo avaliador qualificado.

### **Análise estatística**

Os dados foram analisados por ANOVA usando o procedimento General Linear Model (GLM). As médias obtidas a partir dos parâmetros seminais foram comparadas por meio de um teste t. Foi considerado o efeito do uso de diferentes diluentes, os estados do processo de criopreservação e sua interação. Todos os dados foram analisados usando o pacote estatístico SAS V9.1 (SAS, 2005). As diferenças foram consideradas significativas a um valor de  $P \leq 0,05$ .

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados dos diferentes parâmetros avaliados para determinar a qualidade do sêmen diluído com LS, TY ou CY, em sêmen fresco (SF), refrigerado por 2 h (SR) e sêmen congelado (SC) estão resumidos na Tabela 1.

**Tabela 1. Médias ( $\pm$  SEM) para a qualidade do sêmen criopreservado de cabras dos Alpes franceses diluído com lecitina de soja ou gema de ovo**

Parâmetros	MM (escala, 1-5)	MI (%)	VE (%)
<b>Sêmen fresco</b>			
LS	4.6 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	63.0 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	76.0 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>
TY	4.8 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	62.5 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	75.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>
CY	4.8 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	61.3 $\pm$ 4.3 <sup>a</sup>	71.3 $\pm$ 4.0 <sup>a</sup>
<b>Sêmen refrigerado</b>			
LS	3.1 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	44.0 $\pm$ 12.0 <sup>ab</sup>	51.0 $\pm$ 13.0 <sup>bc</sup>
TY	4.4 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	57.5 $\pm$ 2.5 <sup>a</sup>	71.3 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>
CY	4.0 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	55.0 $\pm$ 3.5 <sup>a</sup>	69.0 $\pm$ 3.1 <sup>ab</sup>
<b>Sêmen congelado</b>			
LS	1.0 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>	11.0 $\pm$ 6.4 <sup>c</sup>	11.0 $\pm$ 7.1 <sup>d</sup>
TY	2.4 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	32.5 $\pm$ 8.3 <sup>b</sup>	41.3 $\pm$ 13.0 <sup>c</sup>
CY	0.5 $\pm$ 0.3 <sup>c</sup>	6.3 $\pm$ 3.8 <sup>c</sup>	2.5 $\pm$ 2.5 <sup>d</sup>

Tratamentos: Andromed® (**LS**; 1% de lecitina de soja), Optidyl® (**TY**: Tris- 20% de gema de ovo) ou citrato-gema de ovo (**CY**). Motilidade de massa (**MM**; escala, 1-5), Motilidade individual (**MI**;%), Viabilidade do esperma (**VE**;%)<sup>abcd</sup> Sobrescritos desiguais entre as linhas indicam diferença estatística significativa ( $P \leq 0,05$ ).

No FS, foram obtidos valores semelhantes entre os grupos ( $P > 0,05$ ) em cada uma das variáveis avaliadas [MM (4,7 $\pm$ 0,26%), VE (74,1 $\pm$ 1,66%) e IM (62,3 $\pm$ 4,0%)]. Os resultados sugerem que a composição dos diluentes utilizados neste estudo afeta a qualidade dos espermatozoides após o processo de descongelamento. No entanto, a qualidade do sêmen pós-descongelamento foi mais afetada quando o diluente à base de LS foi usado em comparação com o TY. Esses resultados são semelhantes aos relatados em cavalos e cervídeos; em que uma qualidade de semente superior é mostrada quando diluentes à base de gema de ovo são usados (Pillet *et al.*, 2012; Stewart *et al.*, 2018). É provável que os resultados encontrados se devam ao fato de que o componente Tris-gema de ovo auxilia na redução da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), mantendo assim o potencial de integridade da membrana ao reduzir o choque térmico causado pelas mudanças de temperatura no processo de criopreservação (Alcay *et al.*, 2016; Seifi-Jamadi *et al.*, 2017). Isso pode estar relacionado ao componente efetivo da gema de ovo

que é a lipoproteína de baixa densidade (20%), que contém o TY e funciona como uma fração crioprotetora que ajuda a manter a melhor qualidade do sêmen (Amirat *et al.*, 2004; Forouzanfar *et al.*, 2010; Alcay *et al.*, 2016).

Ao comparar os efeitos dos diluentes nas condições de SR, não houve diferenças ( $P > 0,05$ ) no MM e MI ( $3,83 \pm 0,4\%$  e  $52,1 \pm 6,0\%$ , respectivamente); entretanto, o percentual de VE foi menor com o diluente baseado em LS em comparação com TY e CY ( $51,0 \pm 13,0$  vs  $71,3 \pm 3,0$  e  $69,0 \pm 3,1$  respectivamente;  $P < 0,05$ ).

Os resultados relatados no presente experimento com relação ao diluente TY concordam com os relatados por Celeghini *et al.* (2008), que indicam maior integridade do acrossoma de espermatozoides de touro, e Konyak *et al.* (2018) que descobriram que, após balancear e congelar o sêmen de cabras, a motilidade espermática é significativamente maior quando se usa o diluente Tris com 20% de gema de ovo, em comparação com aquele composto por 1% de lecitina de soja. Nesse sentido, está comprovado que a lecitina de soja não é capaz de prevenir a peroxidação lipídica que ocorre durante o processo de resfriamento dos espermatozoides (Salmani *et al.*, 2013).

Pesquisas anteriores em ovinos mostraram que o sêmen diluído com lecitina de soja apresenta danos à membrana espermática e, conseqüentemente, danos ao nível mitocondrial, o que resulta em menor mobilidade e fertilidade dos espermatozoides (Del Valle *et al.*, 2012; Lima-Verde *et al.*, 2017). Konyak *et al.* (2018) atribui a baixa qualidade espermática do sêmen exposto ao LS a diferenças na concentração de lecitina de soja utilizada, em relação a isso, Forouzanfar *et al.* (2010) observaram em sêmen de carneiros que diluentes contendo concentrações de 1% de lecitina tinham maior viabilidade espermática, em comparação com 2% de lecitina, e também que a faixa de 1 a 1,5% de lecitina de soja no diluente apresentou melhores características de sêmen após a preservação.

Em SC, os valores de MM, MI e VE foram maiores no sêmen diluído com TY ( $2,4 \pm 0,5$ ,  $32,5 \pm 8,3$ ,  $41,3 \pm 13,0$ , respectivamente;  $P \leq 0,05$ ) em comparação ao sêmen diluído com LS e CY que seus MM, MI e VE diminuiu drasticamente ( $1,0,0 \pm 0,4$ ,  $11,0 \pm 6,4$ ,  $11,0 \pm 7,1$  e  $0,5 \pm 0,3$ ,  $6,3 \pm 3,8$  e  $2,5 \pm 2,5$  respectivamente;  $P \leq 0,05$ ). Da mesma forma, os resultados em nosso estudo em CY pós-descongelamento foram menores em comparação com TY. É provável que esses resultados estejam associados aos componentes do diluente, especificamente a porcentagem de gema de ovo, no diluente CY a concentração de 15% e no TY a 20%. Esses resultados concordam com Fourouzanfar *et al.* (2010), que relatam que a mobilidade e a viabilidade espermáticas pós-descongelamento são maiores quando se usa uma concentração de gema de ovo de 20% do que quando se usa 15%. Da mesma forma, outros estudos confirmam que o aumento na concentração de gema de ovo melhora a preservação da qualidade do

esperma (Amirat *et al.*, 2004; Forouzanfar *et al.*, 2010; Alcay *et al.*, 2016). A razão para essa melhora pode ser devido ao fato de que os fosfolipídios contidos na gema do ovo, como a fosfatidilcolina, são importantes para a manutenção da integridade da membrana do esperma durante o processo de congelamento e pós-descongelamento (Mousa *et al.*, 2002; Amirat *et al.*, 2004; Forouzanfar *et al.*, 2010; Alcay *et al.*, 2016). Portanto, é provável que uma alta porcentagem de gema de ovo melhore a viabilidade espermática observada em TY, e isso contribui para a manutenção dos níveis de ácidos graxos polinsaturados necessários para a membrana espermática, sendo menos suscetível à peroxidação lipídica destrutiva (Cerolini *et al.*, 2001; Kaeoket *et al.*, 2010).

Por outro lado, a baixa qualidade do sêmen pós-descongelamento de CY pode ser devido ao fato de que a gema de ovo tem um alto risco de sofrer contaminação microbiana, o que pode diminuir a qualidade do sêmen pós-descongelamento (Aboagla *et al.*, 2004; Kulakzis *et al.*, 2010); e por ser a gema comercial (CY), não poderia ter uma boa qualidade sanitária, o que prejudicou a qualidade do sêmen pós-congelamento. Outro fator que pode afetar a qualidade do sêmen CY é a dieta e o manejo das aves produtoras (Lima-Verde *et al.*, 2017). Na verdade, vários estudos têm mostrado que as gemas de ovos de diferentes espécies de aves apresentam uma variação em seus componentes, resultando em diferentes efeitos no processo de criopreservação sobre os espermatozoides (Trimeche *et al.*, 1997; Bathgate *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2013). Além disso, a gema do ovo pode conter metabólitos e endotoxinas prejudiciais que afetam a viabilidade do esperma (Vidal *et al.*, 2013), bem como hormônios esteróides que reduzem a motilidade do esperma (El-Sisy *et al.*, 2018). Estudos laboratoriais anteriores revelam que, ao eliminar alguns componentes da gema do ovo por centrifugação; além de certas substâncias na gema que inibem a respiração e a motilidade espermática, sugerindo a substituição da gema inteira pela fração crioprotetora (Amirat *et al.*, 2004).

### CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre o uso dos diferentes diluentes para a conservação de FS e RS; No entanto, o Tris-yolk obteve maior motilidade individual e de massa e viabilidade pós-descongelamento em comparação ao diluente à base de lecitina de soja durante o processo de criopreservação do sêmen de cabra Alpina.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro concedido ao Ministério da Agricultura e Desenvolvimento Rural e ao Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (SADER-CONACYT, México) pelo apoio financeiro concedido através do Fundo Setorial de Pesquisa em Agricultura, Pecuária, Aquicultura, Agrobiotecnologia e Recursos Genéticos Vegetais, 2017-04-291691.

## LITERATURA CITADA

ABOAGLA EME, Terada T. 2004. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*. 62(6):1160-1172. ISSN: 0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.01.013>

AKÇAY E Kulaksız R, Daşkin A, Çebi Ç, Tekin K. 2012. The effect of different dilution rates on post-thaw quality of ram semen frozen in two different egg-yolk free extenders. *Slovenian Veterinary Research*. 49 (2):97-102. ISSN: 1580-4003. [https://www.academia.edu/24162140/The\\_Effect\\_of\\_Different\\_Dilution\\_Rates\\_on\\_Post\\_Thaw\\_Quality\\_of\\_Ram\\_Semen\\_Frozen\\_in\\_Two\\_Different\\_Eggyolk\\_Free\\_Extenders](https://www.academia.edu/24162140/The_Effect_of_Different_Dilution_Rates_on_Post_Thaw_Quality_of_Ram_Semen_Frozen_in_Two_Different_Eggyolk_Free_Extenders)

AKHTER S, Ansari MS, Andrabi SMH, Rakha BA, Ullah N, Khalid M. 2012. Soya-lecithin in extender improves the freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*. 47(5):815-819. ISSN: 1439-0531.x <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01973.x>

ALCAY S, Gokce E, Toker MB, Onder NT, Ustuner B, Uzabacı E, Cavus S. 2016. Freeze-dried egg yolk based extenders containing various antioxidants improve post-thawing quality and incubation resilience of goat spermatozoa. *Cryobiology*. 72(3): 269-273. ISSN: 0011-2240. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.03.007>

AMIRAT L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gérard O, Courtens JL, Anton M. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*. 61(5): 895-907. ISSN: 0093-691X. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00259-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00259-0)

ANDRABI SMH, Ansari MS, Ullah N, Anwar M, Mehmood A, Akhter S. 2008. Duck egg yolk in extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 104(2-4): 427-433. ISSN: 0378-4320. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.07.003>

ANSARI MS, Rakha BA, Akhter S. 2017. Cryopreservation of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in AndroMed® extender; in vitro and in vivo evaluation. *Reproduction in Domestic Animals*. 52(6):992-997. ISSN: 1439-0531. <https://doi.org/10.1111/rda.13008>

BATHGATE R, Maxwell WMC, Evans G. 2006. Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals*. 41(1):68-73. ISSN: 1439-0531. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00623.x>



BELALA R, Briand-Amirat L, Vinciguerra L, Tainturier D, Kaidi R, Thorin C, Bencharif D. 2016. Effect of equilibration time on the motility and functional integrity of canine spermatozoa frozen in three different extenders. *Research in Veterinary Science*. 106: 66-73. ISSN:0034-5288. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.03.010>

CELEGHINI ECC, de Arruda RP, de Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF, Rodrigues PHM. 2008. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Animal Reproduction Science*. 104(2-4):119-131. ISSN:0378-4320. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.02.001>

CEROLINI S, Maldjian, A, Pizzi F, Gliozzi T. M. 2001. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction*. 121(3):395-401. ISSN: 1741-7899. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1210395>

CONAGUA. 2015. Normales climatológicas por estación. *Ciudad de México: Servicio Meteorológico Nacional, Comisión Nacional del Agua*. <https://smn.conagua.gob.mx/es/>

DEL VALLE I, Gómez-Durán A, Holt WV, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. 2012. Soy lecithin interferes with mitochondrial function in frozen-thawed ram spermatozoa. *Journal of Andrology*. 33(4):717-725. ISSN: 1939-4640. <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.014944>

EL-SISY GA, El-Badry DA, El-Sheshtawy RI, El-Nattat WS. 2018. Effects of Phoenix dactylifera pollen grains extract supplementation on post-thaw quality of Arabian stallion semen. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 21(1):40-49. ISSN: 1.311-1477. <https://doi.org/10.15547/bjvm.1044>

FASS. 2010. Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching, 3rd ed. Federation Animal Science Society, Savoy, IL, USA. ISBN: 978-956-14-2161-5.

<https://books.google.com.mx/books?id=EA1QDwAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Guide+for+the+Care+and+Use+of+Agricultural+Animals+in+Agricultural+Research+and+Teaching&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwi8svisttjrAhUIW60KHUttBHMq6AEwAnoECAUQAg#v=onepage&q=Guide%20for%20the%20Care%20and%20Use%20of%20Agricultural%20Animals%20in%20Agricultural%20Research%20and%20Teaching&f=false>

FOROUZANFAR M, Sharafi M, Hosseini S M, Ostadhosseini S, Hajian M, Hosseini L, Nasr-Esfahani MH. 2010. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*. 73(4):480-487. ISSN: 0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.10.005>

GAMAL A, El-Maaty AMA, Rawash ZM. 2016. Comparative blood and seminal plasma oxidant/antioxidant status of Arab stallions with different ages and their relation to semen quality. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 5(5):428-433. ISSN: 2305-0500. <https://doi.org/10.1016/j.apjr.2016.07.006>

JEREZ R, González N, Olaciregui M, Luño V, de Blas I, Gil L. 2016. Use of soy milk combined with different cryoprotectants for the ram semen cryopreservation. *Small Ruminant Research*. 134:34-38. ISSN: 0921-4488. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.12.003>

KAEOKET K, Chanapiwat P, Tummaruk P, Techakumphu M. 2010. Supplemental effect of varying L-cysteine concentrations on the quality of cryopreserved boar semen. *Asian Journal of Andrology*. 12(5):760. <https://dx.doi.org/10.1038/aja.2010.48>

KAFI M, Safdarian M, Hashemi M. 2004. Seasonal variation in semen characteristics, scrotal circumference, and libido of Persian Karakul rams. *Small Ruminant Research*. 53 (1-2):133-139. ISSN: 0921-4488. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2003.07.007>

KONYAK P, Mandal A, Mondal M, Bhakat C, Das SK, Rai S, Karunakaran M. 2018. Preservation of black Bengal buck semen in soybean lecithin based chemically defined extender. *Indian Journal of Animal Research*. 52(8):1151-1154. ISSN: 0976-0555. <https://doi.org/10.18805/ijar.B-3335>

KULAKSIZ R, Çebi Ç, Akçay E, Daşkın A. 2010. The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram semen. *Small Ruminant Research*. 88(1):12-15. ISSN: 0921-4488. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.11.014>

KUMAR P, Saini M, Kumar D, Balhara AK, Yadav SP, Singh P, Yadav PS. 2015. Liposome-based semen extender is suitable alternative to egg yolk-based extender for cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Animal Reproduction Science*. 159:38-45. ISSN: 0378-4320. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.05.010>

LIMA-VERDE IB, Johannisson A, Ntallaris T, Al-Essawe E, Al-Kass Z, Nongbua T, Morrell, JM. 2017. Effect of freezing bull semen in two non-egg yolk extenders on post-thaw sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals*. 53(1): 127-136. ISSN: 1439-0531 <https://doi.org/10.1111/rda.13080>

MAHSUD T, Jamil H, Qureshi ZI, Asi MN, Lodhi LA, Waqas MS, Ahmad A. 2013. Semen quality parameters and selected bio-chemical constituents level in plasma of Lohi rams. *Small Ruminant Research*. 113(1): 175-178. ISSN: 0921-4488. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.04.004>

MOUSSA M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen–thawed bull semen. *Theriogenology*. 57(6):1695-1706. ISSN: 0093-691X. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00682-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00682-9)

NAM. 2002. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Co-produced by the National Academy of Medicine-Mexico and the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International, 1st ed. Harlan Mexico, DF, Mexico. ISBN: 978-0-309-15400-0.

<https://books.google.com.mx/books?id=GyxkAgAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Guide+for+the+Care+and+Use+of+Laboratory+Animals.+ISBN&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjr1pGOtNjrAhUEPq0KHRA3AU0Q6AEwAHoECAIQAg#v=onepage&q=Guide%20for%20the%20Care%20and%20Use%20of%20Laboratory%20Animals.%20ISBN&f=false>

NGOMA L, Kambulu L, Mwanza M. 2016. Factors Influencing goat’s semen fertility and storage: A Literature Review. *Journal of Human Ecology*. 56(1-2):114-125. ISSN: 2456-6608. <https://doi.org/10.1080/09709274.2016.11907045>

NRC. 2007. Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids and New World Camelids. National Research Council, National Academies Press, Washington, USA. ISBN: 978-0-309-47323-1. <https://www.nap.edu/catalog/11654/nutrient-requirements-of-small-ruminants-sheep-goats-cervids-and-new>

PILLET E, Labbe C, Batellier F, Duchamp G, Beaumal V, Anton M, Magistrini M. 2012. Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. *Theriogenology*. 77(2):268-279. ISSN: 0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.08.001>

SALAMON S, Maxwell W MC. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*. 62 (1-3):77-111. ISSN: 0378-4320. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00155-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00155-X)

SALMANI H, Nabi MM, Vaseghi-Dodaran H, Rahman MB, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Shakeri M, Zhandi M. 2013. Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing. *Small Ruminant Research*. 112(1-3):123-127. ISSN:0921-4488. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.12.015>

SAS (Statistical Analysis System) 2005. *Statistical Analysis Software SAS/STAT®*. version 9.1, Cary, N.C., USA: SAS Institute Inc.

SEIFI-JAMADI A, Ahmad E, Ansari M, Kohram, H. 2017. Antioxidant effect of quercetin in an extender containing DMA or glycerol on freezing capacity of goat semen. *Cryobiology*. 75:15-20. ISSN: 0011-2240. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.03.002>

SIEME H, Oldenhof H, Wolkers WF. 2016. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal Reproduction Science*. 169:2-5. ISSN: 0378-4320. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.004>

SINGH MAHAK, Ramteke SS, Ghosh SK, Prasad JK, Rajoriya JS. 2013. Efficacy of egg yolk from three avian species on semen freezability of Tharparkar bull. *Indian Journal Animals Reproduction*. 34(2):25-28. ISSN: 0970 – 2997. [https://scholar.google.com/citations?user=ot596g4AAAAJ&hl=en#d=gs\\_md\\_cita-d&u=%2Fcitations%3Fview\\_op%3Dview\\_citation%26hl%3Den%26user%3Dot596g4AAAAJ%26citation\\_for\\_view%3Dot596g4AAAAJ%3AWF5omc3nYNoC%26tzom%3D300](https://scholar.google.com/citations?user=ot596g4AAAAJ&hl=en#d=gs_md_cita-d&u=%2Fcitations%3Fview_op%3Dview_citation%26hl%3Den%26user%3Dot596g4AAAAJ%26citation_for_view%3Dot596g4AAAAJ%3AWF5omc3nYNoC%26tzom%3D300)

STEWART JL, Shipley CF, Ellerbrock RE, Schmidt L, Lima FS, Canisso IF. 2018. Physiological variations in reproductive and metabolic features of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) bucks throughout the rutting season. *Theriogenology*. 114(1):308-316. ISSN: 0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.04.015>

TRIMECHE A, Anton M, Renard P, Gandemer G, Tainturier D. 1997. Quail egg yolk: a novel cryoprotectant for the freeze preservation of Poitou jackass sperm. *Cryobiology*. 34(4):385-393. ISSN: 0011-2240. <https://doi.org/10.1006/cryo.1997.2009>

VIDAL AH, Batista AM, da Silva ECB, Gomes WA, Pelinca MA, Silva SV, Guerra MMP. 2013. Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*. 109(1):47-51. ISSN: 0921-4488. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.07.022>

ZERON Y, Tomczak M, Crowe J, Arav A. 2002. The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. *Cryobiology*. 45(2):143-152. ISSN: 0011-2240. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(02\)00123-2](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(02)00123-2)