

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(CLÍNICA E REPRODUÇÃO ANIMAL)

CLARA VIEIRA DE SOUZA

EFEITO DA L-CARNITINA EM DILUENTE PARA CRIOPRESERVAÇÃO
DO SÊMEN OVINO

NITERÓI
2019

CLARA VIEIRA DE SOUZA

**EFEITO DA L-CARNITINA EM DILUENTE PARA CRIOPRESERVAÇÃO DO
SÊMEN OVINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Clínica e Reprodução Animal) da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para aprovação a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Área de Concentração: Clínica e Reprodução Animal.

Orientador:

Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão

Coorientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Joanna Maria Gonçalves de Souza-Fabjan

NITERÓI, RJ

2019

CLARA VIEIRA DE SOUZA

**EFEITO DA L-CARNITINA EM DILUENTE PARA CRIOPRESERVAÇÃO DO
SÊMEN OVINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Clínica e Reprodução Animal) da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para aprovação a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Área de Concentração: Clínica e Reprodução Animal.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão – UFF
Orientador

Prof. Dr. André Luís Rios Rodrigues – UFF

Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca – EMBRAPA Caprinos e Ovinos

Niterói
2019

Dedico a Deus, meus pais e
todos os meus professores, por todo
conhecimento adquirido ao longo da
minha trajetória.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado força, sabedoria e ter me abençoado durante essa longa e ao mesmo tempo curta caminhada, em persistir e continuar mesmo nos momentos difíceis.

Aos meus pais, por sempre acreditarem em mim, pelo incentivo, por não medirem esforços para me ajudar. Obrigada por todas as idas e vindas da Fazenda, por todo suporte, por nunca me deixarem enfrentar os obstáculos sozinha. Não poderia escolher pais melhores!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão, por me aceitar como orientada, por ter acreditado em mim, pelas oportunidades de aprendizado, por todo suporte ao longo do experimento. Tenho certeza que poucos orientados tem o privilégio de rodar seu experimento ao lado do seu orientador! E eu tive essa honra, obrigada por tudo.

À minha coorientadora, Prof^ª. Dr^ª. Joanna Maria Gonçalves de Souza-Fabjan, que me acompanha desde a época da graduação. Tenho certeza que você é um anjo enviado por Deus, não tenho palavras para descrever o quão grata eu sou por ter você na minha vida. Primeiro, por ter acreditado em mim, me incentivado, pelos ensinamentos no grupo que fez e faz toda diferença na minha vida, nossa família GPERA. Obrigada por mostrar que o melhor para mim seria o mestrado e realmente foi, pela parceria no laboratório, tudo que sei é graças a você, pelo incentivo, por acreditar na minha capacidade de conduzir um experimento, por sempre estar presente independente da agenda lotada de compromissos, pelos conselhos na vida acadêmica e na vida pessoal. Obrigada pelas idas a sua casa em pleno final de semana para solucionar os problemas do projeto, por estimular meu senso crítico, por todo aprendizado ao longo da escrita do meu artigo e por todos “eu vou te mataaarr”, obrigada por ser muito mais que minha coorientadora, ser minha parceira, amiga, minha irmã científica! Porque se eu falar mãe você me mata, serei eternamente grata pela pessoa excepcional que você é e por tudo que transformou na minha vida. Te amo, minha eterna Rainha Jôjo!

À minha amiga e companheira, Juliana Dantas Rodrigues Santos, nos conhecemos por acaso no primeiro dia de aula, ambas perdidas e no final descobrimos que tínhamos o mesmo orientador! Como eu disse, foi amizade à

primeira vista. Obrigada amiga, por todo conhecimento no laboratório que me foi passado, obrigada pelas ótimas gargalhadas aonde quer que estejamos! Como diz o Mário, só seguir as risadas que encontram a Juliana e a Clara. Sem você eu não seria capaz de conduzir meus experimentos, desde o esgotamento inicial dos carneiros até o último experimento, obrigada pelas dicas, pelas noites acordada comigo, por todas as conversas, por tudo que passamos juntas na fazenda. Agradeço as palavras de amizade, incentivo, boas risadas e histórias que temos muitas para contar. Serei sempre sua Mascote e você minha Dantinhas Arrasadora!

Aos meus amigos do grupo, Vivian Alfradique, Vanessa Barbosa, Augusto Taira, Viviane Brair e Caroline Gomes pelo empenho na realização dos experimentos e por me fazerem rir mesmo nos momentos mais desesperadores. Em especial a Vivian Alfradique, obrigada por todo conhecimento que me foi passado, por ser tão prestativa, por sempre me socorrer e tirar minhas dúvidas! E minhas amigas Luana Cortes e Glaucia Bragança por todas gargalhadas que me proporcionaram e por todas as dicas assim que entrei no mestrado! Obrigada por tudo, sem vocês não seria capaz de finalizar os experimentos e concluir minha dissertação!

À Lúcia Prellwitz, meu muito obrigada a melhor estagiária de todos os tempos, obrigada por sua dedicação por me ajudar nos momentos mais críticos, eu sabia que sempre poderia contar contigo, obrigada por ter se deslocado até a UFRRJ e me ajudar no experimento de estresse oxidativo. Saiba que estará sempre no meu coração!

Ao meu amigo e estatístico, Paulo Sergio Cerqueira Rangel, obrigada por toda organização, parceria, pela rapidez, por estar sempre pronto a me ajudar e muito obrigada por sempre me responder prontamente! Sou eternamente grata por toda ajuda, suporte e por aguentar minhas tentativas de entender a loucura que é o mundo da estatística! Obrigada por tudo!

Aos técnicos da UFF, Mário Felipe Alvarez Balaro e Lendel Correia da Costa, pelo auxílio e apoio na realização dos experimentos. Ao Mário, pelo manejo dos animais utilizados no estudo. Ao Lendel, por me ajudar no laboratório a preparar os meios e lidar com os equipamentos, ter me esclarecido dúvidas e ter me ensinado tanto.

Aos professores do Setor de Reprodução Animal da UFF, em especial ao Prof. Dr. Carlos Vasconcelos, por todas as idas e vindas com o CASA da Fazenda, obrigada pelo apoio, pelas risadas e por ser sempre muito gentil comigo. Ao Prof. Dr. André Luís Rios Rodrigues, pelas palavras de sabedoria e pela preocupação e motivação durante os experimentos. Jamais esquecerei o “está tudo bem Clara? ”, “está dando tudo certo? ”. Obrigada por serem tão maravilhosos!

À Prof^a. Dr^a. Andreza Amaral da Silva da UFRRJ, por realizar as análises de estresse oxidativo comigo, mesmo com a agenda lotada sempre foi muito solícita. Obrigada por ser sempre gentil, dedicada, por todo conhecimento que me passou e mesmo doente não remarcou nosso experimento. Obrigada por tudo professora, serei eternamente grata!

Aos meus amigos Maria Fernanda Carvalho, Max Gomes e Natália Caldas, por todo apoio, por estarem sempre presente nos momentos alegres e difíceis, por todos “calma Clarete, vai dar certo”, obrigada pela amizade, por aguentarem meus desabafos e minhas loucuras desde o ensino médio. Não poderia deixar de agradecer a Maria Fernanda por passar dois dias direto comigo trabalhando nas figuras e tabelas dessa dissertação durante nossas férias (huumm... Cherry)! Obrigada por tudo minhas cerejinhas!

Aos meus amigos Paloma Rodarte, Matheus Moreira, Marcos Jacob, João Paulo Marques, Nélia Silva e Juliana Toledo. Por toda ajuda, suporte, ensinamentos, por acompanharem e me apoiarem ao longo dessa caminhada que foi o mestrado! Obrigada pelas boas gargalhadas e pela amizade! Amo demais cada um de vocês!

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj) pelo financiamento a este projeto através do edital Jovem Cientista do Nosso Estado e da bolsa (E-26/200.310/2017) de estudo durante o mestrado.

*A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios.
Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente,
antes que a cortina se feche e a peça termine sem
aplausos.*

Charlie Chaplin

RESUMO

Este estudo avaliou o efeito de três diferentes concentrações de L-carnitina (LC) em diluidores de sêmen de ovinos contendo ou não gema de ovo para criopreservação. Quatro carneiros da raça Santa Inês foram utilizados durante a estação reprodutiva. O sêmen foi avaliado quanto à sua qualidade e concentração e posteriormente diluído e armazenado em palhetas. Utilizaram-se dois diluidores, TRIS-gema ou o meio comercial optiXcell™ IMV, totalizando seis grupos experimentais: IMV - (0, 5 e 10 mM LC) e TRIS - (0, 5 e 10 mM LC). Após o processo de diluição, congelamento-descongelamento e durante incubação a 38 °C por 3 h, os seguintes parâmetros foram avaliados: cinética espermática, teste hiposmótico, integridade da membrana plasmática, estado de capacitação e nível de lipoperoxidação. O diluidor IMV comprometeu a cinética espermática, com índices menores de VSL, VCL, LIN, WOB e STR, em comparação com o diluidor TRIS ($P < 0,05$). A suplementação de 10 mM de LC afetou positivamente o parâmetro VAP no TRIS e no VSL no diluidor IMV. De fato, a adição de 5 mM de LC melhorou o parâmetro STR no diluidor IMV. Nos grupos suplementados com LC, o IMV teve maior ($P < 0,05$) estresse oxidativo que os tratamentos TRIS. Em conclusão, embora a LC tenha afetado alguns parâmetros isolados, sua suplementação no diluidor de sêmen não teve efeito benéfico consistente sobre o espermatozóide pós-descongelamento e durante toda a incubação por até 3 horas, independentemente do diluente utilizado. O diluidor optiXcell™ IMV comprometeu a cinética espermática e apresentou maior estresse oxidativo comparado ao extensor TRIS.

Palavras-chave: andrologia; antioxidante; *Ovis aries*; Santa Inês; preservação do sêmen; diluente TRIS; lipoperoxidação; CASA; hiposmótico; estresse oxidativo.

ABSTRACT

This study assessed the effect of three different concentrations of L-carnitine (LC) in sheep semen extenders containing or not egg yolk for cryopreservation. Four Santa Inês rams were used during the breeding season. Semen was evaluated regarding its quality and concentration and later diluted and stored in frozen straws. Two extenders were used, either TRIS-egg yolk or the commercial optiXcell™ IMV medium (without egg yolk protein), totaling six experimental groups: IMV – (0, 5 and 10 mM LC) and TRIS – (0, 5 and 10 mM LC). After the freezing-thawing process and throughout incubation at 38 °C for up to 3 h, several parameters were evaluated: sperm kinetics, hypoosmotic, plasma membrane integrity, capacitation status and lipid peroxidation level. The IMV extender compromised sperm kinetics, with significantly lower indices of VSL, VCL, LIN, WOB and STR, compared to the TRIS extender ($P < 0.05$). The supplementation of 10 mM LC positively affected the VAP parameter in TRIS and VSL in IMV extender. Indeed, the addition of 5 mM LC improved the STR parameter in IMV extender. In the groups supplemented with LC, IMV had greater ($P < 0.05$) oxidative stress than TRIS treatments. In conclusion, although LC affected some isolated parameters, its supplementation in semen extender had no consistently beneficial effect on freezing-thawing ram sperm and throughout incubation for up to 3 h, regardless to the extender used. The commercial optiXcell™ IMV medium extender compromised sperm kinetics and it had greater oxidative stress compared to the TRIS extender.

Keywords: andrology; antioxidant; Ovis aries; Santa Inês; semen preservation; TRIS extender; lipoperoxidation; CASA; hypoosmotic; oxidative stress.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO, p. 17

2 CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA, p. 19

2.1 CRIOPRESERVAÇÃO, p. 19

2.2 L-CARNITINA, p. 20

2.2.1 EFEITO DA L-CARNITINA NO METABOLISMO LIPÍDICO, p. 20

2.2.2 EFEITO ANTIOXIDANTE DA L-CARNITINA, p. 22

2.2.3 EFEITO DA L-CARNITINA NO SÊMEN, p. 25

2.3 ANÁLISE COMPUTADORIZADA DO SÊMEN, p. 26

3 OBJETIVOS, p. 31

3.1 OBJETIVO GERAL, p. 31

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS, p. 31

4 MATERIAL E MÉTODOS, p. 32

4.1 REAGENTES, p. 32

4.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS, p. 32

4.3 DESENHO DO ESTUDO, p. 32

4.4 COLETA DO SEMEN E CRIOPRESERVAÇÃO, p. 33

4.4.1 ESGOTAMENTO DAS RESERVAS EXTRA-GONADAIS E COLETA DE SÊMEN, p. 33

4.4.2 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS APÓS A COLETA, p. 33

4.4.3 CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS APÓS A COLETA, p. 33

4.4.4 CRIOPRESERVAÇÃO, p. 34

4.5 ANÁLISES APÓS O DESCONGELAMENTO E INCUBAÇÃO, p. 34

4.6 AVALIAÇÃO COMPUTADORIZADA DA CINÉTICA ESPERMÁTICA, p. 36

4.7 INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA, p. 36

4.8 CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA E REAÇÃO ACROSSOMAL, p. 37

4.9 TESTE HIPOSMÓTICO, p. 37

4.10 QUANTIFICAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO, p. 37

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA, p. 38

5 CAPÍTULO II – EFFECT OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF L-CARNITINE IN SEMEN EXTENDER FOR CRYOPRESERVATION IN SHEEP, p. 39

5.1 ABSTRACT, p. 40

5.2 INTRODUCTION, p. 40

5.3 MATERIAL AND METHODS, p. 42

5.3.1 ETHICS AND FACILITIES, p. 42

5.3.2 REAGENTS, p. 42

5.3.3 EXPERIMENTAL ANIMALS, p. 42

5.3.4 EXPERIMENTAL DESIGN, p. 43

5.3.5 SEMEN COLLECTION, p. 43

5.3.6 MACROSCOPIC CHARACTERISTICS, p. 44

5.3.7 MICROSCOPIC CHARACTERISTICS, p. 44

5.3.8 CRYOPRESERVATION, p. 44

5.3.9 PLASMA MEMBRANE INTEGRITY, p. 45

5.3.10 SPERM CAPACITATION, p. 45

5.3.11 HYPOOSMOTIC TEST, p. 45

5.3.12 QUANTIFICATION OF LIPOPEROXIDATION, p. 46

5.3.13 STATISTICAL ANALYSIS, p. 46

5.4 RESULTS, p. 47

5.4.1 MACROSCOPIC AND MICROSCOPIC CHARACTERISTICS THROUGHOUT
INCUBATION, p. 47

5.4.2 PLASMA MEMBRANE INTEGRITY AND HYPOOSMOTIC TEST, p. 47

5.4.3 SPERM CAPACITATION, p. 48

5.4.4 QUANTIFICATION OF LIPOPEROXIDATION, p. 48

5.5 DISCUSSION, p. 48

5.6 CONCLUSIONS, p. 50

5.7 REFERENCES, p. 51

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS, p. 64

7 Referências Bibliográficas, p. 65

8 ANEXO, p. 73

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Fig. 1 Experimental design of the study. Effect of different concentrations
(Cap. II) of L-carnitine (0, 5, 10 mM) in extender (either TRIS or IMV) for
semen cryopreservation of ram sperm, during incubation of 3 h at
38 °C in 5% CO₂. p. 62
- Fig. 2 Capacitation status of ram sperm: A) immediately after freezing-
(Cap. II) thawing (0 h) and during incubation moments, B) 1 h, C) 2 h and D)
3 h. Sperm was frozen using different extenders (IMV or TRIS) and
concentrations (0, 5 and 10 mM) of L-carnitine (LC) (Sigma C0158).
A,B differ significantly between extenders (IMV vs. TRIS) at the same
moment (during incubation) and at the same concentration of LC. a,b
differ significantly among groups treated with different concentrations
of LC and at the same moment (during incubation). p. 63

LISTA DE TABELAS

TABLE 1 – Ram sperm kinetics and plasma membrane integrity values before and immediately after (0 h) frozen-thawed sperm subjected to different extenders (IMV or TRIS) and concentrations of L-carnitine (LC) for cryopreservation (Mean $\pm$ SEM), p. 57

TABLE 2 – Ram sperm kinematic and plasma membrane integrity values after incubation (1 to 3 hours) of frozen-thawed sperm subjected to different extenders (IMV or TRIS) and concentrations of L-carnitine (LC) for cryopreservation (Mean $\pm$ SEM), p.59

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ROS	Reactive oxygen species
EROs	Espécies reativas de oxigênio
IA	Inseminação Artificial
CAT	Catalase
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
G6PD	<i>Glucose-6-phosphate dehydrogenase</i>
SOD2	<i>Superoxide dismutase 2</i>
GLUT 1	<i>Glucose transporter 1</i>
PRDXs	<i>Peroxiredoxin</i>
GPx	<i>Glutathione Peroxidase</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
LC	L-Carnitina
cDNA	DNA complementar
CoA	Coenzima A
CO ₂	Dióxido de Carbono
CPTs	<i>Carnitine Palmytoil Transferase</i>
CPT1	<i>Carnitine Palmytoil Transferase 1</i>
CPT2	<i>Carnitine Palmytoil Transferase 2</i>
CrAT	<i>Carnitine O-acetyltransferase</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Na ⁺	Sódio
N ₂	Nitrogênio
Ca ⁺²	Cálcio
mM	Milimolar
EG	Etilenoglicol
G	Glicerol
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
O ₂	Oxigênio
OH	Hidroxila

µL	Microlitro
MP	Membrana plasmática
CTC	<i>Chlortetracycline</i> ; clortetraciclina
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CASA	<i>Computer Assisted Sperm Analyses</i>
SCA	<i>Sperm Class Analyser, Microoptics</i>
VCL	<i>Curvilinear velocity</i> ; velocidade curvilinear
STR	<i>Straightness</i> ; retilinearidade
VAP	<i>Average path velocity</i> ; velocidade média da trajetória
VSL	<i>Straight-line velocity</i> ; velocidade linear progressiva
LIN	<i>Linearity</i> ; linearidade
WOB	<i>Wobble</i> ; taxa de oscilação
ALH	<i>Amplitude of lateral head displacement</i> ; amplitude de deslocamento lateral da cabeça
BCF	<i>Beat/cross frequency</i> ; frequência de batimento flagelar cruzado
DABCO	1,4 diazabícclo [2.2.2.] octane
One-way ANOVA	<i>One-way analysis of variance</i> ; análise de variância com um fator
ARRIVE	<i>Animal Research: Reporting of In vivo Experiments</i>
IVF	<i>in vitro fertilization</i>
PM	<i>Plasma membrane</i>
TM	<i>Total motility</i> ; motilidade total
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
AR	<i>Acrosome reaction</i>
Faperj	Fundação de amparo à pesquisa do estado do Rio de Janeiro
CNPq	Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>

1. INTRODUÇÃO

Os pequenos ruminantes são de grande importância e contribuem significativamente para a produção de alimentos, especialmente na economia dos países em desenvolvimento (AMIRIDIS e CSEH, 2012). A criação de ovinos está em expansão no Brasil, o que levou ao desenvolvimento de novas biotécnicas reprodutivas para seu melhoramento genético (CROCOMO, 2012). O avanço nessas biotecnologias, como a preparação de espermatozóides e a inseminação artificial (IA), concentrou-se na preservação da capacidade de viabilidade e fertilização de espermatozóides congelados (CSEH et al., 2012). Espermatozóides criopreservados podem ser armazenados por longos períodos e transportados para todos os continentes, permitindo a disseminação de sêmen de animais geneticamente selecionados. De fato, também é importante para a conservação do sêmen de espécies raras ou ameaçadas de extinção, que podem posteriormente ser usadas para IA ou fertilização *in vitro* (MAIA et al. 2009). Apesar de todos os benefícios da criopreservação de espermatozóides, a disponibilidade de sêmen congelado de boa qualidade para uso em IA é um desafio mundial devido às dificuldades de processamento dessas espécies (MARTI et al. 2011). Assim, menor capacidade de fertilidade é obtida após IA com sêmen congelado comparado ao acasalamento natural. Também é importante ressaltar a grande dificuldade na realização de IA pela via transcervical em ovinos, o que conseqüentemente requer sêmen de melhor qualidade, principalmente quando congelado (MAIA et al. 2010).

É bem conhecido que o processo de congelamento e descongelamento leva a injúrias no espermatozóide (VICHAS et al. 2017). O sucesso da técnica depende da composição do meio de congelamento e, portanto, estratégias foram estabelecidas para otimizar a eficiência da criopreservação. Dezenas de diluidores já foram desenvolvidos e vários tipos de substâncias crioprotetoras foram adicionadas a eles e testados (BAGHSHAHI, 2014; CAMPUZANO 2014; SNOEK, 2017). Destes, os mais utilizados são gema de ovo e glicerol (BAGHSHAHI, 2014; BITTENCOURT, 2018; MAIA, 2009). A gema de ovo tem um papel protetor na membrana e possui na sua composição, vitamina E e ácido ascórbico, que são conhecidos por suas propriedades antioxidantes (NIMALARATNE e WU, 2015). O processo de criopreservação causa estresse oxidativo à célula espermática e a adição de antioxidantes ao congelamento de sêmen e ao meio de resfriamento ajuda a proteger o espermatozóide contra esses

1 danos (MEHDIPOUR et al. 2017). Assim, diferentes substâncias foram testadas no
2 sêmen de ruminantes com sucesso variável, geralmente visando reduzir a formação
3 de espécies reativas de oxigênio (EROs) (BANDAY et al. 2017).

4 A carnitina é um composto endógeno que limita a via de β -oxidação, atuando
5 no transporte de ácidos graxos às mitocôndrias e no transporte de intermediários
6 dessa via. Portanto, pode manter a homeostase celular, contribuindo para a produção
7 de ROS em níveis fisiológicos (VAZ; WANDERS, 2002). O uso de L-carnitina (LC) no
8 diluidor para criopreservação melhorou a qualidade do sêmen e as taxas de
9 recuperação espermática em espécies de caprinos, coelhos e búfalos (BUCAK 2010;
10 LONGOBARDI, 2016; SARIOZKAN, 2014), mas não teve efeito sobre o sêmen do
11 javali (KOZINK et al., 2004). Portanto, aparentemente, o papel da LC pode ser
12 contraditório dependendo da espécie; e a literatura ainda é incipiente quanto ao seu
13 uso no meio diluidor para a criopreservação de sêmen de ovinos. Nossa hipótese é
14 que a adição de LC no meio diluidor para a criopreservação de sêmen de ovinos
15 poderia afetar positivamente a viabilidade espermática pós-descongelamento e sua
16 longevidade, em diferentes tipos de diluidores. Assim, o objetivo do presente estudo
17 foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de LC em diferentes diluidores de
18 sêmen de carneiros visando a criopreservação.

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

2 CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CRIOPRESERVAÇÃO

As células espermáticas representam o produto final da espermatogênese nos machos. A conservação de espermatozoides apresenta propósitos diversos como o uso em tecnologias reprodutivas como a IA e FIV, bem como na conservação de espécies ameaçadas de extinção. A combinação de temperatura de estocagem, taxa de resfriamento, composição química dos diluentes, concentração de crioprotetores, espécies reativas de oxigênio (EROs), composição do plasma seminal e a higiene são os fatores chave que afetam o tempo de vida dos espermatozoides após o descongelamento (BARBAS e MASCARENHAS, 2009).

A opção de armazenar sêmen de animais com valor genético superior, ou de animais raros/em extinção, torna as biotecnologias de criopreservação essenciais nos programas de melhoramento genético das espécies. A criopreservação tem o intuito de desacelerar o metabolismo e a taxa de respiração celular, mantendo a célula em estado quiescente, mas preservando sua integridade. As técnicas de criopreservação utilizam o nitrogênio (N₂) líquido para alcançar temperaturas ultrabaixas e viabilizar a estocagem de gametas, embriões e diversos tipos celulares (DALCIN; LUCCI, 2010).

A criopreservação é um processo que deve ser executado de maneira lenta e gradual, para que isso ocorra alguns métodos e etapas são realizados, os métodos mais difundidos e utilizados são aqueles que utilizam a congelação controlada, cuja taxa de resfriamento acontece gradualmente em máquinas apropriadas. Na prática, independentemente do método de criopreservação, faz-se o uso combinado de diferentes substâncias, como crioprotetores, que podem ser não penetrantes (leite ou gema de ovo) ou penetrantes (glicerol, etilenoglicol ou dimetilsulfóxido), substância tampão (Tris), açúcares (glicose, lactose, sacarose, trealose), sais (citrato de sódio, ácido cítrico) e antibióticos (penicilina, estreptomicina) (EVANS e MAXWELL, 1987). Além disso, os diluentes utilizados para preservação do sêmen de espécies domésticas devem possuir um pH adequado, capacidade tamponante, osmolaridade apropriada e deve proteger as células espermáticas de injúrias criogênicas (SALAMON e MAXWELL, 2000).

O objetivo dessas combinações é permitir a desidratação celular, diminuir a toxicidade da solução de criopreservação e minimizar as injúrias tóxico-osmóticas que a alta concentração de qualquer um deles causa às células (VAJTA, 2000), como por

exemplo, a desidratação celular excessiva que compromete a integridade celular (ARAÚJO-LEMO et al., 2014). As soluções hipertônicas empregadas na criopreservação modulam o fluxo da água para fora da célula, causando desidratação e diminuição do tamanho da célula, resultando em menor probabilidade de formação de cristais de gelo intracelular, o qual está mais fortemente correlacionado com os danos causados pela criopreservação do que a formação de gelo no espaço extracelular (PRICKETT et al., 2015).

2.2 L-CARNITINA

2.2.1 EFEITO DA L-CARNITINA NO METABOLISMO LIPÍDICO

A oxidação de ácidos graxos produz acetil-CoA, que é oxidada a CO₂ no ciclo de Krebs, sendo os elétrons resultantes dessa oxidação transportados através da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial para produção de ATP. Dessa forma, a β -oxidação é a fonte de cerca de 80% da energia para a maioria das células em condições fisiológicas. Ácidos graxos, mobilizados dos estoques citoplasmáticos, formam ésteres com Coenzima A (CoA) com quebra de ATP, resultando em acil-CoA citoplasmático. Através da ação da enzima *carnitine palmitoyltransferase 1* (CPT1), ocorre a transferência do éster de acil-graxo da molécula de CoA para o grupo hidroxil de uma molécula de carnitina, formando acil-carnitina, o qual é transportada por proteínas chamadas porinas na membrana mitocondrial externa, e por difusão facilitada através de uma proteína transportadora na membrana mitocondrial interna (NELSON; COX, 2008). Uma vez na matriz mitocondrial, em reação catalizada por *carnitine palmitoyltransferase 2* (CPT2), o grupamento acil é transferido da molécula acil-carnitina para uma CoA formando acil-CoA, que segue para degradação na via de β -oxidação, enquanto a carnitina livre retorna ao espaço extramitocondrial para continuar a via de transporte (NELSON; COX, 2008; KERNER; HOPPEL, 2000).

A carnitina é uma amina quaternária, sintetizada naturalmente a partir dos aminoácidos metionina e lisina, que possui funções importantes no metabolismo intermediário na maioria dos tecidos de mamíferos (BREMER, 1983; VAZ; WANDERS, 2002). Além de atuar como cofator no transporte de ésteres de ácidos graxos do citoplasma para a matriz mitocondrial, a carnitina também está envolvida no transporte de produtos da β -oxidação de peroxissomos para a mitocôndria para a oxidação em CO₂ e H₂O no ciclo de Krebs, e na modulação da razão acil-CoA/CoA,

através da formação de ésteres com grupamentos acil, minimizando seus efeitos tóxicos para a célula (JAKOBS, 1995; MCGARRY, 1997). L-carnitina [*3-hydroxy-4-(trimethylammonio)butyrate*] é o L-esteroisômero biologicamente ativo da carnitina, utilizado também na suplementação de meios de cultivo visando o incremento da atividade mitocondrial em cultivo de células, oócitos, embriões (DUNNING, 2012) e na suplementação em meio diluente para criopreservação de sêmen (BUCAK et al., 2010; FATTAH et al., 2016; LONGOBARDI et al., 2016).

Carnitine acyltransferases são enzimas que atuam no metabolismo intermediário de ácidos graxos, modulando os *pools* de acetil-CoA e acil-CoA em diversos compartimentos celulares e contribuindo para a homeostase energética da célula (ZAMMIT, 1999). *Carnitine palmitoyltransferase 1* e *2* (CPT1 e CPT2) são dois complexos multiproteína localizados nas membranas mitocondriais externa e interna, respectivamente, cuja função é a transferência dos ésteres acil-graxo entre as moléculas de CoA e carnitina, permitindo o transporte através das membranas mitocondriais e a continuidade da via de β -oxidação (EATON, 1996). A carnitina é, dessa forma, uma molécula limitante nessa via, estando sua deficiência correlacionada com algumas síndromes causadas pela baixa atividade metabólica mitocondrial (NOLAND et al., 2009). CPT1 e CPT2 sofrem ação inibitória de malonil-CoA, um metabólito intermediário da biossíntese de ácidos graxos que sinaliza o balanço entre síntese e degradação desses compostos, de acordo com os requisitos energéticos da célula. CPTs atuam preferencialmente em ésteres de acil-CoA de cadeia longa no espaço extramitocondrial (RAMSAY, 2001).

Carnitine O-acetyltransferase (CrAT) é outra enzima-chave no metabolismo intermediário em mitocôndrias, peroxisomos e retículo endoplasmático, pois realiza a transferência reversível de grupos acetil e acil de acetil-CoA/acil-CoA para a molécula de carnitina, regulando assim as razões acetil-CoA/CoA e acil-CoA/CoA no espaço intracelular, as quais são importantes para a produção de energia e a regulação das atividades celulares (ZAMMIT, 1999). CrAT é um monômero com dois domínios, α e β , cujas interfaces formam um túnel no qual ocorre as reações químicas; no domínio C-terminal é onde se ligam a maioria das CoAs, já o túnel é o local de ligação da carnitina (JOGL, 2003; WU et al., 2003). CrAT possui como substrato preferencial acil-CoAs de cadeia curta (RAMSAY, 2001). Nesse contexto, a LC torna-se vital para a homeostase mitocondrial como substrato para CrAT, já que o excesso de acil-CoA e a indisponibilidade de CoA livre desencadeiam o bloqueio da via energética e o

comprometimento dos metabolismos oxidativo, de carboidratos e aminoácidos, resultando em diminuição na produção de ATP e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (PANDE, 1971; RAMSAY, 2004; MARCOVINA et al., 2013).

A diminuição da expressão de enzimas do sistema carnitina, como CPT1, CPT2 e CrAT e uma alta razão acil-carnitina/carnitina livre são associadas com disfunção da atividade mitocondrial (SHARMA et al., 2008). O silenciamento do gene *CrAT* resulta em quebra da homeostase do sistema carnitina e da bioenergética mitocondrial, além de reduzir a expressão e atividade da enzima antioxidante SOD2, acarretando em aumento do estresse oxidativo dentro da mitocôndria. Também é observado que na ausência de expressão de CrAT ocorrem diminuições no consumo de O₂ e na produção de ATP (SHARMA et al., 2013). Estudo de Seiler et al. (2015), avaliou a relação entre CrAT e o exercício físico em camundongos. Nesse estudo pôde ser observado que a demanda energética celular estimula a diminuição de acetil-carnitina, que é mediada por CrAT. Quando essa enzima está indisponível, após o exercício ou demanda de produção de energia, os níveis de acetil-carnitina aumentam, ao passo que os níveis de acetil-CoA diminuem drasticamente. Após 1h do exercício, os níveis de acetil-CoA são reestabelecidos, enquanto que os níveis de acetil-carnitina permanecem elevados. Esse desequilíbrio na razão acetil-CoA/acetil-carnitina resulta em inércia metabólica e fadiga muscular (SEILER et al., 2015).

A estratégia de suplementação com LC pode reverter os efeitos inibitórios de outros compostos sobre a atividade mitocondrial, como o bloqueio da *citocromo-C oxidase* por fosfeto de alumínio, que resulta em inibição da cadeia transportadora de elétrons e prejuízos na produção de energia além de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (BAGHAEI et al., 2016). A deficiência de LC já foi associada com diversas desordens metabólicas como obesidade, nefrotoxicidade, cirrose, desordens endócrinas e neuronais. Além da sua conhecida ação estimuladora da β -oxidação (DUNNING et al., 2010; SOMFAI et al., 2011), a LC pode ser benéfica também por aumentar a biodisponibilidade de carboidratos, que seriam utilizados para geração de energia, em vias não energéticas como síntese de ácidos nucleicos, ácido hialurônico e sinalização celular (SUTTON, 2010).

2.2.2 EFEITO ANTIOXIDANTE DA L-CARNITINA

Um equilibrado balanço do sistema redox dentro da célula é necessário para que funções vitais, como proliferação celular, expressão gênica, atividade enzimática, sobrevivência e morte celular ocorram de forma eficiente (SUN et al., 2008). Radicais livres são átomos ou moléculas com número ímpar de elétrons valentes, que entram em reações em cadeia desestabilizando outras moléculas e, em ciclo, geram mais radicais livres (revisado por DU PLESSIS et al., 2008). ROS [superóxidos (O_2^-), radicais hidroxil (OH^-) e hidroperóxidos (H_2O_2)] abrangem radicais livres e radicais não livres derivados de oxigênio, produzidos fisiologicamente entre as fases intermediárias de redução do oxigênio na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (AGARWAL et al., 2004; ZHANG, 2007). Uma excessiva produção de ROS, reflexo de um desequilíbrio no metabolismo mitocondrial, leva a danos ao DNA, lipídeos e proteínas via reações desencadeadas pelo estresse oxidativo; por outro lado, um excesso de substâncias antioxidantes pode resultar em quebra da homeostase celular através do bloqueio de vias sinalizadoras e da expressão de fatores de transcrição que são ativados por essas espécies reativas (RAND, 2006). Ainda que possam ser formadas pela ação de enzimas como NADPH oxidases, cerca de 95% das espécies reativas são derivadas do funcionamento normal da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, sendo sua produção, em níveis fisiológicos, importante para a homeostase celular pois funcionam como parâmetro de disfunção mitocondrial e sinalizam vias de reparo e morte celular (MANES, 1995; SAHIN, 2010). Em células de mamíferos, ao passo que a principal fonte de ROS via fosforilação oxidativa é a mitocôndria, a mesma é extremamente susceptível aos efeitos nocivos da alta concentração de ROS (PUDDU et al., 2007). Os danos causados pelo aumento excessivo de ROS em DNA, proteínas e lipídeos mitocondriais desencadeiam na disfunção da cadeia transportadora de elétrons e prejuízo na produção de ATP, o que por sua vez aumentam ainda mais os níveis internos de ROS (GENOVA et al., 2004; CHAN, 2006; PUDDU et al., 2007).

A família de enzimas *peroxiredoxin* (PRDXs) atua na redução de hidroperóxidos, protegendo as células em situações de estresse oxidativo (KOWALTOWSKI, 1998), e são amplamente expressas em oócitos e durante o desenvolvimento embrionário, com exceção de PRDX4, cuja expressão é dependente do estágio de desenvolvimento (LEYENS, 2004). PRDX1 é uma enzima da subfamília 2-Cys PRDXs, que contém uma dobra *thioredoxina*, está localizada no citoplasma e

que realiza sua função detoxificante através da oxidação do conservado resíduo Cys⁵¹ N-terminal, reagindo principalmente com H₂O₂ (NEUMANN, 2009). PRDX1 atua no sistema antioxidante como 'scavenger' (limpador) cooperando com diversas enzimas e vias de sinalização de sobrevivência e morte celular (KIM et al., 2008; GERTZ et al., 2009). Embora seja uma enzima com função antioxidante, PRDX1 pode sofrer ação de altas concentrações de ROS e alterar sua funcionalidade para chaperona (JANG et al., 2004), devido ao fato de ser o resíduo Cys⁵¹ muito instável e altamente reativo; sua superoxidação resulta em ácido sulfínico ou sulfônico, alterando sua conformação (CLAIRBORNE et al., 1999). A elevada expressão de membros dessa família está correlacionada com *downregulation* de ROS e apoptose em células cancerígenas, conhecidas por estarem sujeitas a constante estresse oxidativo (DENG et al., 2005; KWON et al., 2015). Nesse contexto, PRDX1 é um marcador endógeno de estresse oxidativo celular.

A célula espermática é capaz de gerar e degradar ROS, as quais, em pequenas quantidades, são necessárias para o funcionamento normal da célula. Nos últimos anos, vários estudos foram realizados visando entender o papel desses radicais na função espermática. Já é evidente a participação do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio, quando em baixas concentrações, nos eventos que culminam com a fertilização em diferentes espécies. Também é conhecida a susceptibilidade do espermatozoide de mamíferos aos efeitos citotóxicos das ROS e ao estresse oxidativo. A geração excessiva de ROS pode subjugar o sistema intracelular de defesa antioxidante do espermatozoide, que é fraco, devido à escassez de citoplasma, tornando-o susceptível ao estresse oxidativo. Contudo, o plasma seminal, que é rico em antioxidantes, oferece proteção ao espermatozoide, compensando a sua baixa disponibilidade de enzimas antioxidantes.

Diversos estudos têm demonstrado que o processo de criopreservação acarreta estresse oxidativo à célula espermática e que a adição de antioxidantes aos meios de congelação e refrigeração de sêmen ajuda a proteger o espermatozoide contra o dano induzido pelos radicais livres sobre a sua motilidade, viabilidade, produção de energia e integridade do DNA, bem como a interromper a reação em cadeia da peroxidação dos lipídios das membranas espermáticas, em diversas espécies de animais. (MAIA e BICUDO, 2009). Além de contribuir para a homeostase celular através do adequado funcionamento do metabolismo mitocondrial, a LC é conhecida por atuar no sistema antioxidante da célula principalmente via aumento da

expressão e da atividade de enzimas antioxidantes como *OH-1* e *ecNOS*, *catalase* (CAT), *superoxide dismutase* (SOD) *glutathione peroxidase* (GPx), e *γ-glutamyl cysteine synthetase* (γ-GCS) (CALÒ et al., 2006; GHANEM et al., 2014; BAVARI et al., 2016; ROY; VERMA; KRISHNA, 2016; WANG et al., 2016). Ações de ‘scavenging’ e de inibição de peroxidação lipídica também vem sendo associadas à LC, de forma dose-dependente em sistemas de culturas de células sob estresse oxidativo (LI et al., 2012). Os resultados do efeito antioxidante da LC podem ser observados através de menor produção de EROs intracelular, resultando em menores índices de apoptose e maior viabilidade celular (WU et al., 2011; DUNNING; ROBKER, 2012; WANG et al., 2016).

2.2.3 EFEITO DA L-CARNITINA NO SÊMEN

L-carnitina é um importante aminoácido e é um fator essencial no metabolismo dos ácidos graxos, e tem um importante papel na geração de energia metabólica para facilitar o transporte dos ácidos graxos para mitocôndria. LC é encontrada em altas concentrações no epidídimo e esperma dos mamíferos (BROOKS, 1979), é um dos mais potentes antioxidantes, sua função é reduzir a disponibilidade de lipídios para peroxidação, ao transportar os ácidos graxos para a mitocôndria onde ocorre a β-oxidação e assim a geração de energia em ATP, desta forma promove um maior aporte de energia a célula (VAZ; WANDERS, 2002). Tem sido relatado que a carnitina pode proteger a membrana celular contra danos dos EROs e manter a estrutura da membrana, regulando o metabolismo de carboidratos. Sendo um facilitador para o transporte de ácidos graxos ativados na matriz mitocondrial para a β-oxidação, a LC diminui a disponibilidade de lipídios para a peroxidação. Esta ação pode proteger a membrana espermática e a membrana mitocondrial, aumentando assim a viabilidade espermática (ZHANG et al., 2015).

A criopreservação acarreta danos a célula espermática, uma variedade de alterações bioquímicas e funcionais ocorrem nos espermatozóides durante o processo de criopreservação e descongelamento. A cristalização e a peroxidação lipídica que ocorrem na célula induzem ao estresse oxidativo, o que leva à formação de ROS durante a criopreservação. O dano leva à perda da integridade da membrana e à diminuição da motilidade dos espermatozóides, através do estresse oxidativo, a suplementação com antioxidantes pode prevenir esse processo. O sêmen necessita

de bons diluidores e protetores da membrana plasmática (MP), a suplementação da LC no diluente do sêmen para criopreservação tem sido testada em búfalos (LONGOBARDI et al., 2016), coelhos (SARIOZKAN et al., 2014), bodes (BUCAK et al., 2010), bovinos (BUCAK et al., 2010), entre outras espécies, porém a literatura ainda é incipiente com relação a sua ação em sêmen ovino. As doses utilizadas de LC no diluente de sêmen variam de 0,5 mM a 50 mM. Deana et al. (1989) relataram que a LC, quando suplementada no meio diluente, mostrou uma ação diferente nas membranas celulares de diferentes compartimentos do semen bovino e sugere que o uso de altas concentrações de LC resulta no aumento do transporte de cálcio celular e a inibição da motilidade espermática.

O consumo oral da LC já foi reportado, que melhora a qualidade do sêmen em cavalos com oligoastenospermia (STRADAIOLI et al., 2004), e também o uso oral da LC aumentou significativamente a motilidade, viabilidade e integridade do acrossoma espermático em coelhos (EL-NATTAT et al., 2011). Em javalis o consumo oral da LC não foi benéfico para o semen, não houve melhora na motilidade e em nenhuma característica do semen (KOZINK et al., 2004).

Bucak et al. (2010) relataram que a suplementação da LC em diluente para semen caprino melhorou a integridade da membrana acrossomal, porém não melhorou a motilidade espermática após descongelamento, em outro artigo mostrou que melhorou tanto a integridade da membrana acrossomal quanto a motilidade espermática em sêmen bovino após o processo da criopreservação (BUCAK et al., 2010). A LC é um potente antioxidante enzimático, que elimina altas concentrações de EROs que causam patologias espermáticas como, diminuição da produção de ATP, acarreta na lipoperoxidação e perda de motilidade e viabilidade do sêmen (JEULIN; LEWIN, 1996). O benefício do uso da LC suplementada no diluente foi observado em alguns parâmetros, principalmente na motilidade espermática, o que mostra suas propriedades antioxidantes e importante papel na geração de energia para célula espermática e metabolismo do transporte de ácidos graxos (BUCAK et al., 2010).

2.3 ANÁLISE COMPUTADORIZADA DO SÊMEN

Para reduzir a subjetividade das análises espermáticas, nos últimos anos, sistemas automáticos para análise computadorizada de sêmen, o CASA, vêm sendo

desenvolvidos com o objetivo de fornecer dados acurados da motilidade de cada célula espermática e o resumo estatístico das subpopulações (VERSTEGEN et al., 2002). Este sistema pode ainda ser modificado para capturar dados para classificação morfométrica de cada célula examinada (AMANN e KATZ, 2004).

O CASA é um sistema automático utilizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas, fornecendo informações acuradas e precisas do movimento individual de cada célula espermática (AMANN e KATZ, 2004). Independente do fabricante, os diferentes instrumentos são baseados em princípios similares, mas diferem em termos de ótica usada e de software para a identificação do espermatozoide e a construção da trajetória, respectivamente (KRAEMER et al., 1998).

O CASA têm substituído a avaliação de sêmen por microscopia ótica convencional de campo claro também porque fornecem informações mais detalhadas e objetivas sobre várias características da motilidade e da morfometria espermática (VERSTEGEN et al., 2002). A análise computadorizada possibilita a avaliação objetiva de diferentes parâmetros espermáticos como cinética, motilidade, viabilidade e morfologia. As características mais comumente avaliadas pelo CASA são: velocidade curvilínea (VCL); velocidade linear (VSL); velocidade média do percurso (VAP); deslocamento lateral da cabeça (ALH); frequência do batimento cruzado (BCF); LIN; retilinearidade (STR); e WOB (VERSTEGEN et al., 2002).

Para descrever as trajetórias espermáticas, são estudados três parâmetros que resultam da proporção entre as velocidades, são elas a LIN, STR e WOB (BOYERS et al., 1989).

O parâmetro VCL ($\mu\text{m/s}$) é definido como a velocidade média do espermatozoide de um ponto a outro do trajeto realizado, incluindo todos os desvios do movimento de sua cabeça. Trata-se da velocidade da trajetória real do espermatozoide. É sempre a maior das três velocidades e serve como elemento de cálculo para a linearidade. A VSL ($\mu\text{m/s}$) é definida como a velocidade média percorrida em linha reta entre os pontos inicial e final do percurso. É sempre a mais baixa das três velocidades. A VAP ($\mu\text{m/s}$) é definida como a velocidade média ininterrupta do trajeto da célula (VERSTEGEN et al., 2002). Em casos onde a trajetória espermática é regular e linear, com pouco movimento lateral da cabeça, o valor de VAP é quase o mesmo que o de VSL. Porém, quando as trajetórias são irregulares,

não lineares ou onde existe um alto grau de desvio lateral da cabeça em relação à direção do movimento, a VAP será maior que a VSL (MORTIMER, 2000).

A variável ALH (μm) é definida como o valor médio da oscilação lateral da cabeça do espermatozoide enquanto se move ou a amplitude do deslocamento médio da cabeça do espermatozoide em sua trajetória real. A mensuração desse parâmetro está relacionada com a capacidade de penetração na zona pelúcida do oócito, assim, a ALH é um dos parâmetros que tem efeito sobre a fertilização. A BCF (Hz) é definida como a frequência que a cabeça do espermatozoide cruza sua trajetória média por segundo ou o número de vezes que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento (VERSTEGEN et al., 2002). É um parâmetro útil para observar alterações no padrão do batimento flagelar. Se existem mais batimentos/segundos que imagens/segundos, então, a BCF irá ser subestimada (MORTIMER e SWAN, 1995).

A LIN (%) é definida como o valor médio da proporção entre VSL e VCL. Quanto mais o espermatozoide se afasta da velocidade em linha reta, menor será sua linearidade (VERSTEGEN et al., 2002; MORTIMER, 2000). A STR (%) é definida como o valor médio da proporção entre VSL e VAP. Estima a proximidade do percurso da célula a uma linha reta. A variável WOB (%) é definida como o valor médio da proporção entre VAP e VCL (VERSTEGEN et al., 2002).

Uma trajetória circular apresenta baixos valores de LIN uma vez que o trajeto curvilíneo (ou seja, a circunferência do círculo) é maior que o espaço percorrido (ou seja, a distância entre os dois pontos percorridos). Já a trajetória que apresenta altos valores de LIN, é aquela cujo o trajeto curvilíneo apresenta baixa amplitude lateral de cabeça e a direção do movimento se dá relativamente em linha reta. Uma trajetória que percorre pontos uniformemente espaçados e apresenta uma baixa amplitude teria um alto valor de STR, já que o caminho médio se aproximaria do trajeto em linha reta. Uma trajetória circular apresenta baixos valores de STR uma vez que o trajeto médio é a média do trajeto curvilíneo, logo, o STR será maior que a LIN, mas ainda baixo. A variável WOB seria baixa em uma trajetória extensa e ampla, com valores altos de ALH. Porém, apresentaria altos valores em um trajeto circular, já que os trajetos curvilíneo e médio são similares (MORTIMER, 2000).

O desenvolvimento do CASA e a avaliação objetiva dos parâmetros espermáticos ajudou a aumentar a precisão e confiabilidade das análises de motilidade, fornecendo mais informações sobre a qualidade do sêmen quando se compara com a avaliação subjetiva. Além disso, o CASA facilita a comparação de

resultados e faz com que seja possível encontrar diferenças sutis entre machos ou tratamentos (VERSTEGEN et al., 2002). Um estudo recente validou e padronizou o uso do CASA para avaliação da motilidade do sêmen de carneiros, associando a confiabilidade do CASA com o potencial reprodutivo dessa espécie (PALACÍN et al., 2013).

A motilidade é um dos parâmetros mais importantes para a avaliação da qualidade do sêmen, fornecendo importantes informações sobre o status energético da célula espermática. A motilidade ativa é essencial para o espermatozoide ultrapassar o muco cervical e atingir o sítio de fertilização na tuba uterina (YÁNIZ et al., 2006). Entretanto, existem grandes variações na estimativa subjetiva da motilidade, mesmo avaliando a mesma amostra (CONTRI et al., 2010). Alguns estudos, utilizando o CASA em carneiros, associaram valores desejáveis da motilidade espermática (SMITH et al., 1998; SÁNCHEZ-PARTIDA et al., 1999) e de VCL e VAP (ROBAYO et al., 2008) com a fertilidade e a habilidade migratória da célula espermática no muco cervical. Embora a utilização da avaliação *in vitro* de sêmen de ovinos não seja tão difundida como em outras espécies, por exemplo bovinos e suínos, vários estudos vêm aprimorando o uso do CASA nessa espécie (YÁNIZ et al., 2012; PALACÍN et al., 2013; VICENTE-FIEL et al., 2014; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ et al., 2015).

A avaliação de motilidade em seus diversos parâmetros é realizada rigorosamente por um sistema estroboscópico de alta precisão totalmente controlado por computador. Utiliza-se vídeomicrografia que faz o monitoramento constante e análise sequencial do movimento do espermatozoide (AMANN e KATZ, 2004). Por meio do uso de microscópio com contraste de fase, as células espermáticas são mais claramente visualizadas no meio onde estas se encontram, o que permite a detecção e o rastreamento dessas células. O processo de detecção automática das células, denominado segmentação, é então realizado pelo sistema comparando a intensidade da imagem adquirida com um limiar de intensidade pré-estabelecido (MORTIMER, 2000).

O tamanho mínimo e máximo aceitável para a cabeça do espermatozoide de cada espécie é padronizado pelo sistema e o computador irá reconhecer um objeto que cair dentro da faixa de tamanho de cabeça espermática pré-estabelecida.

Partículas presentes na imagem com tamanho abaixo deste limiar serão considerados parte do fundo (MORTIMER, 2000).

1 As avaliações subjetivas da morfologia espermática levam a grandes
2 variações de diagnóstico (HIDALGO et al., 2006). Essas variações acabam limitando
3 a utilidade de tal avaliação morfológica como uma ferramenta de avaliação para
4 predizer a qualidade do sêmen. A introdução do sistema de análise da morfometria
5 espermática automatizada (ASMA) tenta superar os problemas da subjetividade dos
6 métodos de avaliação visual. O sistema ASMA determina o comprimento, a largura e
7 a área da cabeça e possibilita realizar associações destes dados, como
8 largura/comprimento e perímetro. A análise da morfometria espermática proporciona
9 estudar uma série de parâmetros objetivos que facilita a padronização da avaliação
10 morfológica destes gametas (MARCO-JIMÉNEZ et al., 2006). Yániz et al. (2012)
11 testaram o método de avaliação morfométrica automatizada em sêmen ovino e
12 afirmaram que a técnica apresenta resultados objetivos e com alta repetibilidade,
13 sendo executados de forma simples e rápida para a avaliação seminal de rotina.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de L-carnitina em diluentes de sêmen ovino visando a criopreservação.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da adição de duas concentrações de L-carnitina (5 e 10 mM) em dois diluidores (Tris-gema e OPTIXcell – IMV) sobre a cinética espermática após a diluição, no pós-descongelamento e ao longo de diferentes períodos de incubação;
- Avaliar os efeitos da adição de duas concentrações de L-carnitina (5 e 10 mM) em dois diluidores (Tris-gema e OPTIXcell – IMV) sobre a capacitação espermática após a diluição, no pós-descongelamento e ao longo de diferentes períodos de incubação;
- Avaliar os efeitos da adição de duas concentrações de L-carnitina (5 e 10 mM) em dois diluidores (Tris-gema e OPTIXcell – IMV) sobre o estresse oxidativo do sêmen no pós-descongelamento;
- Avaliar os efeitos da adição de duas concentrações de L-carnitina (5 e 10 mM) em dois diluidores (Tris-gema e OPTIXcell – IMV) sobre a integridade de membrana plasmática após a diluição, no pós-descongelamento e ao longo de diferentes períodos de incubação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto obteve aprovação do Comitê de Ética do Uso de Animais, número de protocolo 1009, da Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ. Esta dissertação seguiu as diretrizes do *Animal Research: Reporting of In vivo Experiments* (ARRIVE).

As coletas e criopreservação do sêmen foram realizadas na Unidade de Pesquisa em Caprinos e Ovinos (UniPECO) localizada na Fazenda Escola da Faculdade de Veterinária da UFF, em Cachoeiras de Macacu, RJ. A coleta de sêmen foi realizada no mês de abril (estação reprodutiva).

As análises após descongelamento, foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal Fluminense, localizada em Niterói, RJ. E as análises de estresse oxidativo foram realizadas no laboratório da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, localizada em Seropédica, RJ.

4.1 REAGENTES

Todos os reagentes utilizados foram comprados da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Exceto os seguintes reagentes: álcool 70% pela Jand Química (São Paulo, Brasil), a gema de ovo obtida em supermercado e o diluidor comercial *OptiXcell*™ obtido pela IMV Technologies (L'Aigle, França).

4.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Após exame clínico geral e andrológico (CBRA, 2013), foram selecionados e utilizados quatro machos ovinos da raça Santa Inês, adultos e com fertilidade comprovada. Os animais selecionados foram mantidos sob as mesmas condições de manejo até o final do estudo, sob luminosidade natural, tendo acesso ao pasto e recebendo concentrado comercial de acordo com as suas exigências nutricionais (NRC, 2007), sendo água e sal mineralizado disponíveis *ad libitum*.

4.3 DESENHO DO ESTUDO

Foram utilizados dois diluidores, sendo estes o OptiXcell (OptiXcell Bovine semen preservation medium – IMV Technologies France) e o diluidor Tris-gema (Salamon & Maxwell, 2000), onde foram adicionados duas diferentes concentrações de L-Carnitina (0,5mM, 10mM e 0mM – Grupo Controle). Após coleta do sêmen, foram realizadas as avaliações macroscópicas, sendo estas: volume, odor, cor, aspecto e microscópicas: motilidade, integridade de membrana, capacitação espermática,

hiposmótico, concentração e cálculo para diluição do sêmen em diferentes concentrações de L-carnitina nos diluente. Após a diluição, foi realizada nova avaliação espermática. Posteriormente o sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 mL, sendo encaminhado para a máquina TK 3000®, onde ocorreu a curva de resfriamento (37 °C a 5 °C) seguida da curva de congelamento (5 °C a – 120 °C), após o término, as palhetas foram conservadas em nitrogênio líquido. Após o descongelamento, novas análises foram realizadas e posteriormente o sêmen foi incubado a 38° C, em meio Fert-TALP a 5% de CO₂, onde os parâmetros de cinética, integridade de membrana, hiposmótico e capacitação espermática foram realizados nos momentos de 0h, 1h, 2h e 3h.

4.4 COLETA DO SÊMEN E CRIOPRESERVAÇÃO

4.4.1 ESGOTAMENTO DAS RESERVAS EXTRA-GONADAIS E COLETA DE SÊMEN

O esgotamento das reservas extra-gonadais dos animais foi realizado por meio de coleta diária de sêmen dos carneiros por um período de quatro dias consecutivos, seguido de dois dias de descanso sexual (KAYA et al., 2002). A coleta de sêmen foi realizada por meio de vagina artificial específica para pequenos ruminantes, aquecida a uma temperatura média de 45°C e acoplada a um tubo falcon graduado. A coleta foi realizada com o auxílio de uma fêmea em estro como manequim.

4.4.2 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS APÓS A COLETA

Após a coleta, o sêmen foi avaliado quanto as características macroscópicas (cor, odor, aspecto e volume). A medição do volume foi realizada por meio do uso de pipetas graduadas.

4.4.3 CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS APÓS A COLETA, DILUIÇÃO E ENVASE DO SÊMEN

Em seguida, uma alíquota foi diluída (1/100) em solução salina para a realização da análise da motilidade em microscopia de contraste de fase no CASA. Essas análises foram realizadas individualmente e os ejaculados que apresentaram motilidade igual ou superior a 70% foram selecionados para a congelação. Em seguida, foi formado o *pool* do sêmen dos quatro carneiros, com objetivo de eliminar o fator individual como uma variável da análise (BUCAK; TECKIN, 2007), seguida da

1 realização da determinação da concentração espermática. Utilizando-se uma câmara
2 de Neubauer, foi realizada a concentração espermática ($\times 10^6$) do *pool*, após diluição
3 de 10 μ L de sêmen em 8,0 mL de água destilada, obtendo-se a diluição de 1:800. E
4 assim determinado o volume de diluidor necessário para a concentração final de
5 100×10^6 espermatozoides por palheta de sêmen.

6 Após a determinação da concentração espermática realizava-se o cálculo da
7 quantidade de sêmen a ser utilizado para o preparo de 12 palhetas de sêmen para
8 cada tratamento. Em seguida diluía-se o sêmen com o meio diluente de acordo com
9 cada grupo experimental. Durante as etapas de diluição do sêmen, a amostra e os
10 meios diluentes foram mantidos em banho-maria a 36° C. Foram utilizados dois
11 diluidores OptixCell (OptiXcell Bovine semen preservation medium – IMV
12 Technologies France) e o diluidor Tris-gema (Salamon & Maxwell, 2000) e diferentes
13 concentrações de L-Carnitina (5 mM, 10 mM e 0 mM – Grupo Controle).

14 Após a diluição foram realizadas novas avaliações da cinética espermática,
15 bem como a avaliação da capacitação espermática pela técnica de CTC, de
16 integridade de membrana e teste hiposmótico. Em seguida, o sêmen foi envasado nas
17 palhetas de 0,25 mL e lacradas com álcool polivinílico (Biodux Laboratórios Ltda.).

18 4.4.4. CRIOPRESERVAÇÃO

19 Ao término do envase e identificação dos respectivos grupos, as palhetas de
20 0,25 mL foram dispostas no cilindro de porta-palhetas do sistema TK 3000® (TK
21 Tecnologia em Congelação Ltda, Uberaba, Brazil), previamente aquecido a 32° C. O
22 sistema foi programado para executar uma curva onde a refrigeração do sêmen
23 ocorreu a 0,25°C/minuto até 5°C, sendo as palhetas mantidas nessa temperatura até
24 completar 4 horas do início da refrigeração, após chegarem a esta temperatura,
25 totalizando cerca de 5 horas e 30 minutos. Após este período, a etapa de congelação
26 foi iniciada, com a velocidade de – 20°C/minuto até atingir a temperatura de –120°C,
27 onde em seguida as palhetas foram imersas em N₂L. Posteriormente foram
28 organizadas em raques e armazenadas em botijão criogênico a – 196° C até a sua
29 descongelação e análise.

30 4.5 ANÁLISES APÓS O DESCONGELAMENTO E INCUBAÇÃO

Após o congelamento, as amostras de sêmen de cada tratamento foram descongeladas no descongelador de sêmen automatizado (Descongelador de sêmen e embriões – WTA - Brasil, SP) a 37 °C durante 30 segundos. Após o descongelamento, as seguintes análises foram realizadas: cinética, integridade da membrana plasmática, avaliação da capacitação espermática e teste hiposmótico. Em seguida os tratamentos foram incubados a 38°C, em meio Fert-TALP a 5% de CO₂, durante um período de 3 horas, e todas as análises foram realizadas no momento de 0h, 1h, 2h e 3h.

4.6 AVALIAÇÃO COMPUTADORIZADA DA CINÉTICA ESPERMÁTICA

Uma alíquota de 20µL das amostras de cada grupo, após realização de diluição em solução salina (1/100), foi mantido a 37°C e em seguida submetido a avaliação computadorizada da motilidade (CASA; Computer Assisted Semen Analyser; Nikon Eclipse Ci – Nikon Corporation - Japão), utilizando a configuração de *setup* (Anexo 3) conforme recomendado pelo fabricante para carneiros. Para cada amostra foram avaliados cinco campos escolhidos aleatoriamente para os parâmetros de cinética espermática: motilidade total (MT, %); motilidade progressiva (MP, %); velocidade de trajeto (VAP, %); velocidade curvilínea (VCL, %); velocidade progressiva (VSL, %); amplitude lateral da cabeça (ALH, µm); frequência de batimentos de flagelo (BCF, Hz); retilinearidade (STR, %); linearidade (LIN, %); WOB é definida como o valor médio da proporção entre VAP e VCL(WOB, %).

4.7 INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA

Esta avaliação foi realizada de acordo com descrito por Yániz et al. (2013) modificado por Alfradique et al. (2018). Foi utilizado a associação de duas sondas fluorescentes: laranja de acridina e iodeto de propídeo (0,5 mg/mL). O iodeto de propídeo é uma sonda não permeável à MP que se liga ao ácido nucleico emitindo uma fluorescência vermelha. A laranja de acridina é uma sonda permeável à MP e seletiva ao ácido nucleico que emite uma fluorescência verde. A análise foi realizada no sistema CASA conectado a um microscópio sob iluminação de epifluorescência equipada com conjunto de filtro apropriado (465-495 nm excitação e 515-555 nm emissão), utilizando um aumento de 100 X. Pelo menos 300 espermatozoides por lâmina foram analisados.

5.8 CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA E REAÇÃO ACROSSOMAL

O estado de capacitação foi avaliado pelo teste de clortetraciclina (CTC) e baseou-se na técnica descrita por Pérez et al. (1996) modificado por Olivares et al. (2017). Uma solução de CTC a 0,75 mM foi preparada diariamente num tampão contendo Tris a 20 mM, NaCl a 130 mM e cisteína a 5 mM, pH 7,8. Para coloração, 0,01 mL de amostra de esperma foram misturados com 0,01 mL de solução de CTC em uma lâmina. Em seguida, uma gota de uma solução antifadante (0,22 M 1,4-diazabícclo [2.2.2] octano, DABCO, Sigma) foi misturada para retardar a perda da fluorescência de CTC. Para a avaliação dos padrões de CTC, as amostras foram observadas em microscópio (Nikon Eclipse Ci5) sob iluminação de epifluorescência, em aumento de 1000x com imersão em óleo. Duzentos espermatozóides por lâmina foram avaliados e classificados em três grupos, como descrito por Cormier et al. (1997) fluorescência brilhante em toda a cabeça (células não-capacitadas, padrão F); banda livre de fluorescência na região pós-acromática (células capacitadas, padrão B); e fluorescência total sobre toda a cabeça, exceto por uma fina e brilhante faixa de fluorescência ao longo da região equatorial (células com reação acrossômica, padrão AR).

4.9 TESTE HIPOSMÓTICO

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática, o teste hiposmótico (HOST) foi realizado de acordo com Chowdhury et al. (2013). Alíquotas de 30 µL de sêmen fresco foram coletadas e colocadas em tubos plásticos tipo eppendorf com 1 mL de solução hiposmótica de 100 mOsm/kg, composta por água MilliQ. Posteriormente, essas alíquotas foram incubadas a 37° C por 60 min e avaliadas através de preparo úmido entre lâmina e lamínula, por meio de microscopia de contraste de fase, com aumento de 1000x e imersão. Duzentos espermatozóides foram contados.

4.10 QUANTIFICAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO

A metodologia utilizada foi descrita por Ohkawa et al. (1979). O método baseia-se na reação entre as moléculas de ácido tiobarbitúrico e malondialdeído, produzindo uma cor rosa que é quantificada por espectrofotometria em um comprimento de onda de 532 nanômetros (nm). As reações ocorrem a uma temperatura entre 90°C e 100°C,

em pH ácido. Alíquotas de 500 µL de cada tratamento e 1000 µL de solução de ácido tricloroacético a 10% (10% TCA) foram centrifugados a 1800 x *g* por 15 min a uma temperatura de 15°C, para possibilitar a precipitação de proteínas. Alíquotas de 500 µL do sobrenadante foram colocadas em tubos de ensaio juntamente com 500 µL de ácido tiobarbitúrico a 1%, dissolvido em hidróxido de sódio 0,05 N. Os tubos contendo esta mistura foram incubados num banho maria a 100°C durante 10 min e depois arrefecidos num banho de gelo.

As espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) foram quantificadas em espectrofotômetro, com comprimento de 532 nm. Os resultados foram comparados a uma curva padrão feita com malondialdeído. O malondialdeído é uma das principais substâncias que reagem com os TBARs e sua concentração é determinada usando o valor de $1,56 \times 10^5 \times M^{-1} mL^{-1}$ como coeficiente de extinção molar de malondialdeído. A peroxidação lipídica no sêmen é expressa em nanogramas de TBARs / mL de sêmen.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro Wilk e à homogeneidade da variante de Levene. Quando as suposições paramétricas foram satisfeitas, ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey foi usada para comparação das médias. Quando a necessidade de ferramentas não-paramétricas foi verificada, elas foram analisadas por Mann Whitney ou Kruskal Wallis, seguido por post hoc de Dunn para comparações múltiplas. Para investigar a existência de interação entre diluentes e tratamentos, utilizou-se o modelo linear geral (GLM). Dois pacotes de software foram utilizados, os programas IBM SPSS Statistics versão 19 e BioEstat 5.3. Diferenças com valores de $P < 0,05$ foram estatisticamente significantes.

1 5 CAPÍTULO II

2
3
4
5
6
7
8 **Effect of different concentrations of L-carnitine in semen extender for**
9 **cryopreservation in sheep**

10
11 *Efeito de diferentes concentrações de L-carnitina no diluente para criopreservação*
12 *em ovinos*
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

26
27 **Artigo submetido ao periódico: Cryobiology**

28 **Em: 12/01/2019**

29 **Qualis: A2 – Medicina Veterinária**
30
31

Effect of different concentrations of L-carnitine in extender for semen cryopreservation in
sheep

Clara Vieira de Souza^{a*}, Felipe Zandonadi Brandão^a, Juliana Dantas Rodrigues Santos^a,
Vivian Angélico Pereira Alfradique^{a,1}, Vanessa Moreira Barbosa dos Santos^a, Maria Clara da
Cruz Moraes^a, Paulo Sergio Cerqueira Rangel^b, Andreza Amaral da Silva^c, Joanna Maria
Gonçalves Souza-Fabjan^{a*}

^a Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brasil Filho,
64, Niterói, RJ, 24320-340, Brazil

^b Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade do Grande Rio, Rua Professor José de
Souza Herdy, 1160, Duque de Caxias, RJ, 25071-202, Brazil

^c Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rodovia
BR 465, Km 07, Seropédica, RJ, 23890-000, Brazil

* Corresponding authors.

E-mail addresses: claravieira.vet@gmail.com (CV Souza); joannavet@gmail.com (JMG
Souza-Fabjan).

Postal address: Rua Vital Brasil Filho, 64 – Santa Rosa, Niterói – RJ, 24320-340,¹ Brazil.
Universidade Federal Fluminense, Setor de Reprodução Animal.

¹ Present address: Faculdade de Medicina Veterinária, Av. Peter Henry Rolfs, s/n, Viçosa, MG, 36570-900, Brazil.

5.1 ABSTRACT

This study assessed the effect of three different concentrations of L-carnitine (LC) in sheep semen extenders containing or not egg yolk for cryopreservation. Four Santa Inês rams were used during the breeding season. Semen was evaluated regarding its quality and concentration and later diluted and stored in frozen straws. Two extenders were used, either TRIS-egg yolk or the commercial optiXcell™ IMV medium (without egg yolk protein), totaling six experimental groups: IMV – (0, 5 and 10 mM LC) and TRIS – (0, 5 and 10 mM LC). After the freezing-thawing process and throughout incubation at 38 °C for up to 3 h, several parameters were evaluated: sperm kinetics, hypoosmotic, plasma membrane integrity, capacitation status and lipid peroxidation level. The IMV extender compromised sperm kinetics, with significantly lower indices of VSL, VCL, LIN, WOB and STR, compared to the TRIS extender ($P < 0.05$). The supplementation of 10 mM LC positively affected the VAP parameter in TRIS and VSL in IMV extender. Indeed, the addition of 5 mM LC improved the STR parameter in IMV extender. In the groups supplemented with LC, IMV had greater ($P < 0.05$) oxidative stress than TRIS treatments. In conclusion, although LC affected some isolated parameters, its supplementation in semen extender had no consistently beneficial effect on freezing-thawing ram sperm and throughout incubation for up to 3 h, regardless to the extender used. The commercial optiXcell™ IMV medium extender compromised sperm kinetics and it had greater oxidative stress compared to the TRIS extender.

Keywords: andrology; antioxidant, *Ovis aries*; semen preservation; lipid peroxidation; CASA; hypoosmotic; oxidative stress.

5.2 Introduction

Small ruminants are of great importance and have a significant contribution to food production, especially in the economy of developing countries [3]. Sheep farming is under

expansion in Brazil, which has led to the development of new reproductive biotechniques for their genetic improvement [14]. The advance in these biotechnologies, such as sperm preparation and artificial insemination (AI), has focused on preserving the viability and fertilization capacity of frozen spermatozoa [15]. Cryopreserved sperm can be stored for long periods and transported to all continents, allowing to disseminate semen from genetically selected animals. Indeed, it is also important for the semen conservation of rare or endangered species, which can later be used for AI or *in vitro* fertilization [22]. Despite all benefits of sperm cryopreservation, the availability of good quality frozen semen for use in AI is a challenge worldwide due to processing difficulties in these species [24]. Thus, lower fertility is obtained after AI with frozen semen compared to natural mating. It is also important to highlight the great difficulty in performing AI by the transcervical route in sheep, which consequently requires higher quality semen, especially when frozen [23].

It is well known that the process of freezing and thawing leads to injuries in the sperm cell [37]. The overall success of the technique depends on the freezing medium composition and thus strategies have been established to optimize cryopreservation efficiency. Dozens of extenders have already been developed and several types of cryoprotective substances have been added to them and tested [4, 11, 34]. Out of those, the most commonly used are egg yolk and glycerol [4, 7, 22]. Egg yolk has a membrane protective role, and vitamin E and ascorbic acid, which are known for their antioxidant properties [27]. The cryopreservation process causes oxidative stress to the sperm cell and the addition of antioxidants to the semen freezing and cooling media helps to protect the sperm against these damages [26]. Thus, different substances have been tested in semen of ruminants with variable success, usually aiming to reduce the reactive oxygen species (ROS) formation [5].

Carnitine is an endogenous compound limiting the β -oxidation pathway, acting in the transport of fatty acids to mitochondria and in the transport of intermediates of this pathway.

Therefore, it can maintain cellular homeostasis, contributing to the ROS production in physiological levels [36]. The use of L-carnitine (LC) in the extender for cryopreservation enhanced semen quality and sperm recovery rates in goat, rabbit and buffalo species [8, 21, 32] but did not have any effect on boar semen [20]. Hence, apparently the role of LC may be contradictory depending on the species; and the literature is still incipient regarding its use in the extender medium for the cryopreservation of sheep semen. We hypothesized that LC addition in the extender medium for the cryopreservation of sheep semen could positively affect the post-thawing sperm viability and its longevity, especially in the commercial extender medium without the presence of egg yolk. Thus, the objective of the present study was to assess the effect of different LC concentrations in sheep semen extenders containing or not egg yolk for cryopreservation.

5.3 Materials and methods

5.3.1 Ethics and facilities

This project was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals (# 1009), of Universidade Federal Fluminense, Niterói, Brazil. This study also followed the guidelines of Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments (ARRIVE).

Semen collection and cryopreservation were carried out at the Unidade de Pesquisa em Caprinos e Ovinos (UniPECO) located in Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, Brazil. Semen collection was performed in the breeding season (May).

5.3.2 Reagents

All reagents used were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA); except for the following ones: 70% alcohol by Jand Química (São Paulo, Brazil) and the commercial extender optiXcell™ obtained by IMV Technologies (L'Aigle, France).

5.3.3 Experimental Animals

After general clinical and andrological examination [12], four Santa Ines rams with proven fertility were selected and used. The animals were kept under the same management conditions until the end of the study, under natural light, having access to the pasture and receiving commercial concentrate according to their nutritional requirements [28], with mineralized water and salt available *ad libitum*.

5.3.4 Experimental Design

After semen collection, macroscopic (volume, odor, color, appearance) and microscopic (sperm kinetics, membrane integrity, capacitation, hypoosmotic) assessments were performed. Then, a pool of semen of all males was formed (to eliminate any individual factor; [9]), and semen was diluted using different concentrations of LC (Sigma C0158). Two extenders were used, either the commercial optiXcell™ semen preservation medium (IMV Technologies, L'Aigle, France) or TRIS egg yolk [31]. For each extender, different concentrations of LC (0, 5 and 10 mM) were supplemented, totaling six experimental groups. After dilution, the same microscopic evaluations besides sperm concentration were performed. Later, semen from each treatment was packed in 0.25 mL straws and cryopreserved in liquid nitrogen. Immediately after thawing (0 h), semen samples from each treatment were evaluated (the same microscopic analyses) and lipoperoxidation of sperm cell was quantified. Then, semen was incubated in Fert-TALP medium at 38 °C in 5% CO₂, and the same parameters were assessed at 1 h, 2 h and 3 h of incubation.

5.3.5 Semen collection

Firstly, exhaustion of the extra-gonadal reserves of the rams was carried out by daily semen collection for four consecutive days, followed by two days of sexual rest [19]. Afterwards, semen collection was performed using a specific artificial vagina for small ruminants, heated to an average temperature of 45 °C and coupled to a graduated 50 mL tube

(Falcon Plastics, Becton Dickinson UK Ltd, Cowley, Oxford, UK). The collection was performed with the aid of an estrogenized female as a mannequin.

5.3.6 Macroscopic characteristics

The macroscopic characteristics were evaluated after collection in undiluted semen. Volume measurement was performed using graduated pipettes. Color, appearance and odor were subjectively analyzed.

5.3.7 Microscopic characteristics

Semen samples from each group were maintained in a water bath at 37 °C and were diluted in saline (1:100). Sperm motility parameters were analyzed by objective computer-assisted semen analysis (CASA) using the SCA[®] system (Sperm Class Analyzer Microptic, Nikon Eclipse Ci – Tokyo, Japan). For each sample, nine selected fields were automatically evaluated for the parameters of spermatoc kinetics: Total Motility (TM, %); Average path velocity (VAP, $\mu\text{m/s}$); Curvilinear Velocity (VCL, $\mu\text{m/s}$); Straight-line velocity (VSL, $\mu\text{m/s}$); Amplitude of lateral head displacement (ALH, $\mu\text{m/s}$); Beat/Cross Frequency (BCF, Hz); Straightness (STR, %); Linearity (LIN, %); WOB is defined as the mean value of the ratio between VAP and VCL (WOB, %). All ejaculates that had motility $\geq 70\%$ were selected for freezing. Sperm concentration was determined by Neubauer chamber.

5.3.8 Cryopreservation

Semen was diluted according to each experimental group and a final concentration of 100×10^6 sperm/straw was used. During dilution, all semen samples and extenders were kept in a water bath at 37 °C. Aliquots were packed into 0.25-mL straws and placed in an automated freezing system (TK 3000[®]; TK Tecnologia em Congelação Ltda, Uberaba, Brazil), preheated at 32 °C. A cooling rate of 0.25 °C/min until 5 °C was applied, and this temperature was maintained for 4 h. The freezing rate used was 20 °C/min from 5 to -120 °C, when the straws were immersed in liquid nitrogen (196 °C) [22].

5.3.9 Plasma Membrane Integrity

This technique was performed following the method previously described by our group [1]. The association of two fluorescent probes was used: acridine orange [10.000x] and propidium iodide (0.5 mg/mL). Propidium iodide is a non-permeable probe to PM that binds to the nucleic acid and emits red fluorescence. Acridine orange is a MP-permeable probe and selective to nucleic acid that emits green fluorescence. The analysis was performed in the CASA system connected to a microscope under epifluorescence illumination equipped with appropriate filter set (465-495 nm excitation and 515-555 nm emission) using a 100 X magnification. At least 300 sperm per slide were analyzed.

5.3.10 Sperm capacitation

The capacitation status was assessed by chlortetracycline test (CTC) and was based on the technique previously described by our group [30]. A 0.75 mM CTC solution was prepared daily in a buffer containing 20 mM Tris, 130 mM NaCl and 5 mM cysteine, pH 7.8. For staining, 0.01 mL of sperm sample was mixed with 0.01 mL of CTC solution in one slide. Then, a drop of antifouling solution (0.22 M 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octane, DABCO, Sigma) was mixed to retard loss of CTC fluorescence. For the evaluation of the CTC standards, the samples were observed in a microscope under epifluorescence, increasing by 1000x with immersion in oil. At least 200 sperm cells per slide were assessed and classified into three groups: bright fluorescence throughout the head (non-enabled cells, standard F); fluorescence-free band in the post-achromatic region (trained cells, standard B); and total fluorescence over the entire head, except for a thin and bright fluorescence band along the equatorial region (cells with an acrosome reaction, AR pattern).

5.3.11 Hypoosmotic Test

For the evaluation of plasma membrane integrity, the hypoosmotic test (HOST) was performed according to Chowdhury et al. [13]; aliquots of 30 μ L of fresh semen were collected

and placed in Eppendorf tubes with 1 mL of hypoosmotic solution of 100 mOsm/kg, composed of MilliQ water. Subsequently, these aliquots were incubated at 37 °C for 60 min and evaluated through wet preparation between slide and cover slip, by means of phase contrast microscopy in a 1000x fold increase and immersion. At least 200 sperm cells were counted.

5.3.12 Quantification of lipoperoxidation

The methodology used was described by Ohkawa et al. [29]. The method is based on the reaction between the molecules of thiobarbituric acid and malondialdehyde, producing a rose color that is quantified by spectrophotometry at a wavelength of 532 nanometers (nm). Reactions occur at a temperature between 90 °C and 100 °C, at acidic pH. Aliquots of 500 µL of each treatment, and 1000 µL of 10% trichloroacetic acid solution (10% TCA) were centrifuged at 1800 g for 15 min and at 15 °C for precipitation of proteins. Aliquots of 500 µL of the supernatant were placed in test tubes along with 500 µL of 1% thiobarbituric acid, dissolved in 0.05 N sodium hydroxide, freshly prepared. The tubes containing this mixture were incubated in a boiling bath at 100 °C for 10 min and then cooled in an ice bath at 0 °C.

The Thiobarbituric Acid Reactive Species (TBARs) were quantified in a spectrophotometer, at a length of 532 nm. The results were compared to a standard curve made with malondialdehyde. Malondialdehyde is one of the major substances that react with the TBARs and its concentration is determined using the value $1.56 \times 10^5 \times \text{M}^{-1} \text{mL}^{-1}$ as the molar extinction coefficient of malondialdehyde. Lipid peroxidation in semen is expressed in nanograms of TBARs/mL of semen.

5.3.13 Statistical analysis

Data were submitted to the Shapiro Wilk normality test and Levene variance homogeneity. When the parametric assumptions were satisfied, one-way ANOVA followed by Tukey test were used for comparison of means. When the need for non-parametric tools was verified, they were analyzed by either Mann Whitney or Kruskal Wallis followed by Dunn's

post hoc for multiple comparisons. In order to investigate the existence of interaction between diluents and treatments, general linear model (GLM) was used. Two software packages were used, IBM SPSS Statistics version 19 and BioEstat 5.3 programs. Differences with values of $P < 0.05$ were statistically significant.

5.4. Results

5.4.1 Macroscopic and microscopic characteristics throughout incubation

All macroscopic analyses were according to the standard for the ovine species [12]. The average values of the sperm kinetics before and post-thawing are shown in Table 1. Overall, the IMV extender consistently compromised ram sperm kinetics, resulting in lower ($P < 0.05$) rates of total motility, fast sperm and indices of VAP, VSL, VCL, LIN and STR, compared to the TRIS extender, regardless the concentration of LC. The supplementation of 10 mM LC positively affected the VAP parameter in TRIS and VSL in IMV extender. Indeed, the addition of 5 mM LC improved the STR parameter in IMV extender.

The sperm kinetics values throughout incubation are listed in Table 2. Similarly, the TRIS extender promoted better indices of VSL, LIN, WOB and STR than IMV extender along incubation, regardless the presence of LC. There were no benefits of the LC addition throughout the incubation and 10 mM was deleterious to few parameters (ALH, LIN and WOB) compared to the control (0 mM) in TRIS extender group.

5.4.2 Plasma Membrane Integrity and Hypoosmotic test

Regarding to plasma membrane integrity, there was no statistical difference among the groups treated with different concentrations of LC (Table 1) before and after thawing. The values throughout incubation were similar ($P > 0.05$) (Table 2). For hypoosmotic test, throughout incubation, the average number of intact cells was higher in TRIS extender groups supplemented with 10 mM LC at 1 h (31.0 ± 1.8) and 5 mM LC at 2 h (29.6 ± 5.1) compared

do the respectively extender IMV groups. All the other groups in different time points, showed no significance ($P > 0.05$).

5.4.3 Sperm capacitation

Regarding to capacitation status, few differences were obtained at 2 h, where TRIS 5 mM LC group had more acrosome-reacted cells when compared to IMV 5 mM LC group. At 3 h, the percentage of acrosome-reacted cells was higher in TRIS 0 mM when compared to IMV 0 mM group. On the other hand, IMV 10 mM LC had a higher percentage of noncapacitated cells when compared to the TRIS 10 mM LC group (Figure 2).

5.4.4 Quantification of lipoperoxidation

IMV groups supplemented with 5 and 10 mM LC had greater ($P > 0.05$) oxidative stress than TRIS supplemented with 5 and 10 mM LC, respectively.

5.5 Discussion

This study investigated the role of different concentrations of LC added in the semen extender for cryopreservation of ram sperm, due to its action as an antioxidant and energy supplier. Thus, we have hypothesized that LC supplementation could positively affect the post-thawing ram sperm viability and its longevity, especially in the commercial extender medium without the presence of egg yolk (which naturally contains high amount of antioxidant). Overall, our hypothesis cannot be supported in the current study, since the LC effect was random i.e., it did not consistently affect any group in any concentration used.

In the current study, the post-thawing motility was not statistically different among groups, corroborating to the reported for goat frozen-thawed sperm, where LC addition resulted in insignificant increase in sperm motilities [8]. Conversely, in other species such as human [6], bovine [10] and rabbit [32], sperm motility improved after LC supplementation, probably due

1 to its antioxidant effect. Perhaps this could be related to a species effect or to the concentration
2 used.

3 We expected that throughout incubation LC supplementation would promote a higher
4 sperm longevity, due to its function as energy supplier and being a facilitator for activated fatty
5 acid transport into the mitochondrial matrix for β -oxidation. However, there was no statistical
6 difference in the groups with or without LC. Perhaps, the concentrations used were not enough
7 to positively affect ram sperm. LC supplementation in the semen extender has been previously
8 tested in buffalo [21], goat [10], rabbit [32], humans [6], mouse [2], rooster [17], cat [25],
9 among others; but, in these studies, incubation times were not evaluated. Thus, further studies
10 with different concentrations of LC should be tested and maybe can reach better results
11 throughout incubation.

12 LC supplementation did not affect the lipoperoxidation in the current study. However,
13 we observed significant improvement in lipoperoxidation when comparing both extenders. In
14 IMV groups, oxidative stress was much higher than in TRIS, probably due the action of egg
15 yolk providing an antioxidant support. Our results contrast with those reported by Fattah et al.
16 [17], who showed that the presence of LC in extender medium increased rooster lipid
17 peroxidation after freeze-thawing. Similarly, frozen-thawed epididymal cat sperm was better
18 when LC was added to sperm extender [25]. It has been reported that carnitine can protect cell
19 membrane against ROS damage and maintain membrane structure by regulating carbohydrate
20 metabolism. LC should decrease the availability of lipids for peroxidation [18, 33, 38], but in
21 our study this function of LC could not be observed.

22 Regarding plasma membrane integrity, hypoosmotic test and capacitation status, we did
23 not find any protective effect of LC. According to Manee-in et al. [25], the damages caused by
24 oxidative stress may cause few changes on the plasma membrane structure. LC can also
25 stabilize the plasma membrane of the sperm, perhaps via interaction with membrane

phospholipid, which modulates fluidity of plasma membrane. This event can allow the sperm to resist damages during cryopreservation [36]. Bucak et al. [8] have reported that LC supplementation in the semen extender in goats provided significant improvement in sperm acrosomal integrity in freezing-thawing semen. Another study showed that the *in vitro* supplementation of the semen extender with LC provided significant improvement in acrosomal integrity in bovine semen after the cryopreservation process [10]. There is a possibility that this difference obtained in different studies and the current one could be related to a species effect or to the concentration used.

Deana et al. [16] reported that addition of 20 mM LC to ejaculated bovine spermatozoa suspended in a medium containing radioactive ^{45}Ca , showed different actions on the membranes of different cellular compartments of bovine sperm and suggested that the addition of high concentrations resulted in an increase of cellular calcium transport and inhibition of sperm motility. Interestingly, it has been reported that the oral consumption of LC improved the semen quality of oligoasthenospermic stallions [35]. However, dietary supplemented boars had no beneficial effect on their semen characteristics [20]. This variance may be related to various factors such as species, components of extenders, procedure of freezing and different concentrations of antioxidant used.

In this study, we have shown that adding LC to ram sperm extender medium increased randomly some of sperm kinetic parameters, with the best results observed in the TRIS group both before and after thawing. Therefore, the egg-yolk antioxidants are believed to prevent spermatozoa damage from free radicals that may excessively generate during the freeze-thaw process.

5.6 Conclusions

Overall, although LC affected some isolated parameters, its supplementation in semen extender had no consistently beneficial effect on freezing-thawing ram sperm and throughout incubation for up to 3 h, regardless to the extender used. The commercial optiXcell™ IMV medium extender compromised sperm kinetics and it had greater oxidative stress compared to the TRIS extender. Our findings provide a platform to further investigate and design protocols to test the beneficial effects of LC supplementation on cryopreserved ram semen.

Conflicts of interest

The authors declare there are no known conflicts of interest associated with this publication.

Acknowledgments

The authors thank the Federal Fluminense University – InfraLabPesq/PROPPi and FAPERJ for funding the project. FZB is a CNPq fellow.

5.7 References

- [1] V.A.P., Alfradique, R.I.T.P. Batista, J.M.G. Souza-Fabjan, L.R. Côrtes, G.M. Bragança, C.V. Souza, L.C. Costa, F.Z. Brandão, Supplementation of 17 β -estradiol and progesterone in the co-culture medium of bovine oviductal epithelial cells and ovine spermatozoa reduces the sperm kinematics and capacitation, *Reprod. Biol.* 18(4) (2018) 368-379. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2018.10.004>.
- [2] E. Aliabadi, F. Karimi, T. Talaei-Khozani, Effects of L-Carnitine and Pentoxifylline on Carbohydrate Distribution of Mouse Testicular Sperm Membrane, *Iran J. Med. Sci.* 38 (2) (2013) 107-115. PMID: [23825890](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23825890/).

- 1 [3] G.S. Amiridis, S. Cseh, Assisted reproductive technologies in the reproductive management
2 of small ruminants, Anim. Reprod. Sci. 130 (2012) 152-161.
3 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.01.009>.
- 4 [4] H. Baghshahi, A. Riasi, A.H. Mahdavi, A. Shirazi, Antioxidant effects of clove bud
5 (Syzygium aromaticum) extract used with different extenders on ram spermatozoa during
6 cryopreservation, Cryobiology 69 (2014) 482-487.
7 <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.10.009>.
- 8 [5] M.N. Banday, F.A. Lone, F. Rasool, M. Rashid, A. Shikari, Use of antioxidants reduce lipid
9 peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its cryopreservation,
10 Cryobiology 74 (2017) 25-30. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.12.008>.
- 11 [6] S. Banihani, A. Agarwal, R. Sharma, M. Bayachou, Cryoprotective effect of L-carnitine on
12 motility, vitality and DNA oxidation of human spermatozoa, Andrology 46 (2013) 637-641.
13 <https://doi.org/10.1111/and.12130>.
- 14 [7] R.F. Bittencourt, E. Oba, C.E.A. Biscarde, H.C. Azevedo, M.V. Bittencourt, G.F.O.
15 Menezes, A.S. Lima, K.M. Fuchs, A.L. Ribeiro Filho, Dimethylacetamide and trehalose for
16 ram semen cryopreservation, Cryobiology 85 (2018) 1-6.
17 <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.10.266>.
- 18 [8] M.N. Bucak, S. Sariozkanb, P.B. Tuncera, F. Sakinc, A. Atessahin, R. Kulaksız, M. Cevik,
19 The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancryrensis*) sperm
20 parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities, Small Rum. Res. 89 (2010) 24-30.
21 <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.11.015>.
- 22 [9] M.N. Bucak, N. Tekin, Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid
23 storage of ram semen, Small Rum. Res. 73 (2007) 103-108.
24 <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.12.001>.

- 1 [10] M.N. Bucak, P.B. Tuncer, S. Sariozkan, N. Baspınar, M. Taspınar, K. Cayan, A. Bilgili,
2 P.P. Akalın, S. Buyukleblebici, S. Aydos, S. Ilgaz, A. Sunguroglu, D. Oztuna, Effects of
3 antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: Antioxidants
4 protect DNA integrity against cryodamage, *Cryobiology* 61 (2010) 248-253.
5 <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.09.001>.
- 6 [11] M. M. Campuzano, M. Álvarez-Rodríguez, M. Álvarez, J. Tamayo-Canul, L. Anel, P. de
7 Paz, F. Martínez-Pastor, Post-thawing quality and incubation resilience of cryopreserved ram
8 spermatozoa are affected by antioxidant supplementation and choice of extender,
9 *Theriogenology* 83 (2014) 520-528. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.10.018>.
- 10 [12] CBRA, Manual para exame andrológico e avaliação de semen animal. 3.ed., Brasil, 2013,
11 pp. 34-37.
- 12 [13] S. Chowdhury, S. Das, T. Gupta, D. Sana, S. Bose, A comparative study with murrah
13 buffalo and indigenous gir spermatozoa to hypo-osmotic swelling test, *Anim. Med. Res.* 3(2)
14 (2013) 159-164.
- 15 [14] L.F. Crocomo, W.C. Marques Filho, F.C. Landim Alvarenga, S.D. Bicudo, Peculiarities
16 of oocyte harvesting for in vitro production of sheep embryos, *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 36
17 (2012) 25-31.
- 18 [15] S. Cseh, V. Faigl, G.S. Amiridis, Semen processing and artificial insemination in health
19 management of small ruminants, *Anim. Reprod. Sci.* 69 (2012) 827-836.
20 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.01.014>.
- 21 [16] R. Deana, F. Rigoni, M. Francesconi, L. Cavallini, P. Arlasn, N. Siliprandi, Effect of l-
22 carnitine and l-aminocarnitine on calcium transport, motility, and enzyme release from
23 ejaculated bovine, *Biol. Reprod.* 41 (1989) 949-955.
24 <https://doi.org/10.1095/biolreprod41.5.949>.

- 1 [17] A. Fattah, M. Sharafi, R. Masoudi, A. Shahverdi, V. Esmaili, A. Najafi, L-Carnitine in
2 rooster semen cryopreservation: Flow cytometric, biochemical and motion findings for frozen-
3 thawed, *Cryobiology* 74 (2016) 148-153. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.10.009>.
- 4 [18] I. Gulçin, Antioxidant and antiradical activities of l-carnitine, *Life Sci.* 78 (2006) 803–811.
5 <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.05.103>.
- 6 [19] A. Kaya, M. Aksoy, T. Tekeli, Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics,
7 ionic composition and enzymatic activity of seminal plasma in rams, *Small Rum. Res.* 44
8 (2002) 153-158. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(02\)00051-2](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(02)00051-2).
- 9 [20] D.M. Kozink, M.J. Estienne, A.F. Harper, J.W. Knight, Effects of dietary L-carnitine
10 supplementation on semen characteristics in boars, *Theriogenology* 61 (2004) 1247–1258.
11 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.07.022>.
- 12 [21] V. Longobardi, A. Salzano, G. Campanile, R. Marrone, F. Palumbo, M. Vitiello, G. Zullo,
13 B. Gasparini, Carnitine supplementation decreases capacitation-like changes of frozen-thawed
14 buffalo spermatozoa, *Theriogenology* 88 (2016) 236:243.
15 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.031>.
- 16 [22] M.S. Maia, S.D. Bicudo, H.C. Azevedo, C.C. Sicherle, D.B. Sousa, L. Rodello, Motility
17 and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-
18 oxidants, *Small Rum. Res.* 85 (2009) 85–90.
19 <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.07.001>.
- 20 [23] M.S. Maia, S.D. Bicudo, C.C. Sicherle, L. Rodello, I.C.S. Gallego, Lipid peroxidation and
21 generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with
22 antioxidants, *Anim. Reprod. Sci.* 122 (2010) 118–123.
23 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.004>.

- 1 [24] J.I. Martí, I.M. Aparicio, M. García-Herreros, Sperm morphometric subpopulations are
2 differentially distributed in rams with different maturity age in cryopreserved ejaculates,
3 *Theriogenology* 76 (2011) 97–109. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.01.022>.
- 4 [25] S. Manee-in, S. Parmornsupornvichit, S. Kraiprayoon, T. Tharasanit, P. Chanapiwat, K.
5 Kaeoket, L-carnitine supplemented extender improves cryopreserved-thawed cat epididymal
6 sperm motility. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 27 (2014) 791-796.
7 <https://doi.org/10.5713/ajas.2013.13565>.
- 8 [26] M. Mehdipour, H. Daghigh Kia, M. Nazari, A. Najafi, Effect of lecithin nanoliposome or
9 soybean lecithin supplemented by pomegranate extract on post-thaw flow cytometric,
10 microscopic and oxidative parameters in ram semen, *Cryobiology* 78 (2017) 34-40.
11 <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.07.005>.
- 12 [27] C. Nimalaratne, J. Wu, Hen Egg as an Antioxidant Food Commodity: A Review. *Nutrients*,
13 7 (2015) 8274–8293. <https://doi.org/10.3390/nu7105394>.
- 14 [28] National Research Council, NRC. *Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep,*
15 *Goats, Cervids, and New World Camelids.* The National Academies Press, Washington DC,
16 2007.
- 17 [29] H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi, Assay for lipid peroxides in animal tissues by
18 thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.* 95 (1979) 351-358. [https://doi.org/10.1016/0003-](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
19 [2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3).
- 20 [30] C.C.S. Olivares, J.M.G. Souza-Fabjan, J.F. Fonseca, M.F.A. Balara, V.J.F. Freitas, R.V.
21 Oliveira, F.Z. Brandão, Comparison of Different Sperm Selection Techniques in Ram Frozen-
22 Thawed Sperm, *Acta Sci. Vet.* 45 (2017) 1431.
- 23 [31] S. Salamon, W.M.C. Maxwell, Storage of ram semen, *Anim. Reprod. Sci.* 62 (2000) 77-
24 111. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00155-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00155-X).

- 1 [32] S. Sariozkan, S. Ozdamar, G. Turk, F. Canturk, A. Yay, In vitro effects of L-carnitine
2 and glutamine on motility, acrosomal abnormality, and plasma membrane integrity of rabbit
3 sperm during liquid-storage, *Cryobiology* 68(3) (2014) 349-353.
4 <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.04.006>.
- 5 [33] S.C. Sikka, Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive
6 technology, *J. Androl.* 25(1) (2004) 5:18. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02751.x>.
- 7 [34] P.P.N. Snoeck, L.C.O. Moura, M.C. Silva, M. Machado-Neves, M.I.V. Melo, L.G.D.
8 Heneine, M. Henry, Effect of storage conditions on the LDL effectiveness in ovine sperm
9 cryopreservation, *Cryobiology* 75 (2017) 88-90.
10 <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.01.007>.
- 11 [35] G. Stradaoli, L. Sylla, R. Zelli, P. Chiodi, M. Monaci, Effect of L-carnitine administration
12 on the seminal characteristics of oligoasthenospermic stallions, *Theriogenology* 62 (2004) 761–
13 777. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.11.018>.
- 14 [36] F.M. Vaz, R.J.A. Wanders, Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem. J.* 361 (2002)
15 417-429. <https://doi.org/10.1042/bj3610417>.
- 16 [37] L. Vichas, I.A. Tsakmakidis, D. Vafiadis, G. Tsousis, E. Malama, C.M. Boscios, The
17 effect of antioxidant agents addition and freezing method on quality parameters of frozen
18 thawed ram, *Cell Tissue Bank* 19(1) (2017) 113-121. [https://doi.org/10.1007/s10561-017-](https://doi.org/10.1007/s10561-017-9633-6)
19 [9633-6](https://doi.org/10.1007/s10561-017-9633-6).
- 20 [38] W. Zhang, F. Li, H. Cao, C. Li, C. Du, L. Yao, H. Mao, W. Lin, Protective effects of L-
21 carnitine on astheno- and normozoospermic human semen samples during cryopreservation,
22 *Zygote* 24(2) (2015) 293–300. <https://doi.org/10.1017/S0967199415000180>.

Table 1. Ram sperm kinetics and plasma membrane integrity values before and immediately after (0 h) frozen-thawed sperm subjected to different extenders (IMV or TRIS) and concentrations of L-carnitine (LC) for cryopreservation (Mean $\pm$ SEM)

			Before freezing			0 h		
			0 mM LC*	5 mM LC*	10 mM LC*	0 mM LC*	5 mM LC*	10 mM LC*
Total motility (%)	IMV**		79.9 $\pm$ 10.8 ^{Aa}	79.7 $\pm$ 13.2 ^{Aa}	77.8 $\pm$ 6.1 ^{Aa}	27.5 $\pm$ 5.2 ^{Aa}	30.4 $\pm$ 2.0 ^{Aa}	33.7 $\pm$ 12.6 ^{Aa}
	TRIS**		76.6 $\pm$ 15.9 ^{Aa}	88.2 $\pm$ 3.9 ^{Aa}	80.2 $\pm$ 10.5 ^{Aa}	41.7 $\pm$ 8.1 ^{Ba}	32.8 $\pm$ 12.5 ^{Aa}	42.3 $\pm$ 9.0 ^{Aa}
Fast sperm (%)	IMV		45.4 $\pm$ 11.5 ^{Aa}	50.0 $\pm$ 18.4 ^{Aa}	37.9 $\pm$ 10.9 ^{Aa}	1.9 $\pm$ 1.1 ^{Ba}	8.3 $\pm$ 6.7 ^{Aa}	10.9 $\pm$ 6.1 ^{Aa}
	TRIS		51.1 $\pm$ 11.2 ^{Aa}	52.8 $\pm$ 15.2 ^{Aa}	51.7 $\pm$ 1.4 ^{Ba}	13.4 $\pm$ 7.9 ^{Aa}	8.8 $\pm$ 5.8 ^{Aa}	8.3 $\pm$ 6.2 ^{Aa}
Medium sperm (%)	IMV		7.7 $\pm$ 1.7 ^{Aa}	8.2 $\pm$ 2.3 ^{Aa}	5.5 $\pm$ 1.9 ^{Aa}	1.2 $\pm$ 0.9 ^{Aa}	2.5 $\pm$ 0.6 ^{Aa}	3.9 $\pm$ 2.3 ^{Aa}
	TRIS		7.6 $\pm$ 2.1 ^{Aa}	8.2 $\pm$ 3.0 ^{Aa}	8.8 $\pm$ 4.3 ^{Aa}	4.4 $\pm$ 2.4 ^{Aa}	2.4 $\pm$ 0.5 ^{Aa}	7.8 $\pm$ 7.5 ^{Aa}
Slow sperm (%)	IMV		26.7 $\pm$ 4.4 ^{Aa}	21.5 $\pm$ 5.9 ^{Aa}	27.2 $\pm$ 6.5 ^{Aa}	24.3 $\pm$ 4.3 ^{Aa}	18.2 $\pm$ 3.6 ^{Aa}	18.9 $\pm$ 5.1 ^{Aa}
	TRIS		26.3 $\pm$ 2.6 ^{Aa}	20.8 $\pm$ 4.9 ^{Aa}	17.0 $\pm$ 5.3 ^{Aa}	28.3 $\pm$ 9.4 ^{Aa}	27.2 $\pm$ 11.7 ^{Aa}	24.7 $\pm$ 10.5 ^{Aa}
VCL (μ m/s)***	IMV		94.7 $\pm$ 7.2 ^{Aa}	100.9 $\pm$ 23.3 ^{Aa}	91.1 $\pm$ 22.0 ^{Aa}	31.2 $\pm$ 7.9 ^{Aa}	56.5 $\pm$ 26.8 ^{Aa}	57.8 $\pm$ 12.4 ^{Aa}
	TRIS		102.9 $\pm$ 15.5 ^{Aa}	109.6 $\pm$ 11.7 ^{Aa}	119.1 $\pm$ 8.6 ^{Aa}	46.6 $\pm$ 5.4 ^{Ba}	48.0 $\pm$ 9.3 ^{Aa}	47.5 $\pm$ 19.2 ^{Aa}
VAP (μ m/s)***	IMV		60.8 $\pm$ 7.7 ^{Aa}	67.6 $\pm$ 21.3 ^{Aa}	50.9 $\pm$ 15.1 ^{Aa}	72.4 $\pm$ 75.5 ^{Aa}	27.7 $\pm$ 9.9 ^{Aa}	27.4 $\pm$ 5.3 ^{Aa}
	TRIS		64.5 $\pm$ 16.1 ^{Aa}	75.6 $\pm$ 8.8 ^{Aab}	89.8 $\pm$ 11.1 ^{Bb}	27.5 $\pm$ 2.5 ^{Aa}	30.5 $\pm$ 8.5 ^{Aa}	23.7 $\pm$ 5.0 ^{Aa}
VSL (μ m/s)***	IMV		39.0 $\pm$ 9.0 ^{Aa}	44.6 $\pm$ 15.1 ^{Aa}	30.1 $\pm$ 9.2 ^{Aa}	10.6 $\pm$ 2.4 ^{Aa}	14.8 $\pm$ 1.6 ^{Aab}	17.9 $\pm$ 2.9 ^{Ab}
	TRIS		44.0 $\pm$ 13.2 ^{Aa}	52.3 $\pm$ 7.8 ^{Aa}	43.6 $\pm$ 12.5 ^{Aa}	20.9 $\pm$ 4.8 ^{Ba}	23.6 $\pm$ 9.3 ^{Aa}	17.2 $\pm$ 3.1 ^{Aa}
ALH (μ m/s)***	IMV		4.3 $\pm$ 0.3 ^{Aa}	4.4 $\pm$ 0.4 ^{Aa}	3.8 $\pm$ 0.2 ^{Aa}	3.2 $\pm$ 0.5 ^{Aa}	2.9 $\pm$ 0.8 ^{Aa}	2.6 $\pm$ 1.6 ^{Aa}
	TRIS		3.7 $\pm$ 1.0 ^{Aa}	4.0 $\pm$ 0.7 ^{Aa}	4.1 $\pm$ 0.2 ^{Aa}	3.2 $\pm$ 0.8 ^{Aa}	3.3 $\pm$ 0.8 ^{Aa}	2.6 $\pm$ 0.7 ^{Aa}
STR (%)***	IMV		59.4 $\pm$ 7.7 ^{Aa}	69.6 $\pm$ 4.3 ^{Ab}	59.5 $\pm$ 3.2 ^{Aa}	64.4 $\pm$ 11.5 ^{Aa}	62.7 $\pm$ 9.7 ^{Aa}	59.0 $\pm$ 13.2 ^{Aa}
	TRIS		68.0 $\pm$ 8.0 ^{Aa}	69.3 $\pm$ 7.0 ^{Aa}	62.3 $\pm$ 13.4 ^{Aa}	67.9 $\pm$ 11.2 ^{Aa}	80.5 $\pm$ 4.1 ^{Ba}	76.5 $\pm$ 9.8 ^{Aa}
BCF (Hz)***	IMV		8.2 $\pm$ 2.0 ^{Aa}	9.0 $\pm$ 2.6 ^{Aa}	8.4 $\pm$ 2.1 ^{Aa}	5.9 $\pm$ 0.3 ^{Aa}	6.3 $\pm$ 3.5 ^{Aa}	5.3 $\pm$ 3.9 ^{Aa}
	TRIS		9.4 $\pm$ 1.3 ^{Aa}	9.0 $\pm$ 2.7 ^{Aa}	8.1 $\pm$ 0.8 ^{Aa}	8.0 $\pm$ 2.3 ^{Aa}	9.4 $\pm$ 2.8 ^{Aa}	7.7 $\pm$ 1.9 ^{Aa}
LIN (%)***	IMV		40.8 $\pm$ 6.8 ^{Aa}	47.5 $\pm$ 1.0 ^{Aa}	38.3 $\pm$ 8.2 ^{Aa}	36.8 $\pm$ 15.2 ^{Aa}	34.1 $\pm$ 12.8 ^{Aa}	28.6 $\pm$ 8.7 ^{Aa}
	TRIS		47.7 $\pm$ 11.8 ^{Aa}	48.6 $\pm$ 11.9 ^{Aa}	45.1 $\pm$ 14.6 ^{Aa}	38.4 $\pm$ 11.9 ^{Aa}	55.1 $\pm$ 7.8 ^{Ba}	51.3 $\pm$ 20.3 ^{Aa}
WOB (%)***	IMV		64.1 $\pm$ 4.6 ^{Aa}	66.2 $\pm$ 6.9 ^{Aa}	64.2 $\pm$ 11.6 ^{Aa}	55.4 $\pm$ 14.2 ^{Aa}	52.9 $\pm$ 12.1 ^{Aa}	47.8 $\pm$ 4.0 ^{Aa}
	TRIS		69.3 $\pm$ 9.3 ^{Aa}	69.8 $\pm$ 12.5 ^{Aa}	75.3 $\pm$ 5.1 ^{Aa}	55.5 $\pm$ 8.2 ^{Aa}	63.6 $\pm$ 12.0 ^{Aa}	65.2 $\pm$ 17.5 ^{Aa}
PM integrity (%)***	IMV		33.6 $\pm$ 9.1 ^{Ab}	16.5 $\pm$ 10.4 ^{Aa}	17.0 $\pm$ 8.8 ^{Aa}	4.4 $\pm$ 2.2 ^{Aa}	2.0 $\pm$ 2.4 ^{Aa}	3.2 $\pm$ 2.5 ^{Aa}
	TRIS		30.2 $\pm$ 4.4 ^{Aa}	31.9 $\pm$ 15.6 ^{Aa}	28.8 $\pm$ 10.4 ^{Aa}	6.7 $\pm$ 1.5 ^{Aa}	4.2 $\pm$ 2.6 ^{Aa}	7.4 $\pm$ 10.7 ^{Aa}

- 1 Within a column, values with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).
- 2 a,b differ among groups treated with different concentrations of LC (0, 5, 10 mM) at the same moment (before freezing or 0 h).
- 3 A,B differ between extenders (IMV vs. TRIS) at the same moment (before freezing or 0 h) and at the same concentration.
- 4 *Concentrations of L-carnitine (Sigma C0158) used (either 0, 5 or 10 mM) in the semen extender for cryopreservation.
- 5 ** Extenders: IMV: OptiXcell™; TRIS egg yolk [31].
- 6 *** VCL: curvilinear velocity; VAP: average path velocity; VSL: straight-line velocity; ALH: amplitude of lateral head displacement; STR:
- 7 straightness; BCF: beat/cross frequency; LIN: linearity; WOB: wobble; PM integrity: plasma membrane integrity.
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25

1 Table 2. Ram sperm kinematic and plasma membrane integrity values after incubation (1 to 3 hours) of frozen-thawed sperm subjected to different
 2 extenders (IMV or TRIS) and concentrations of L-carnitine (LC) for cryopreservation (Mean $\pm$ SEM).

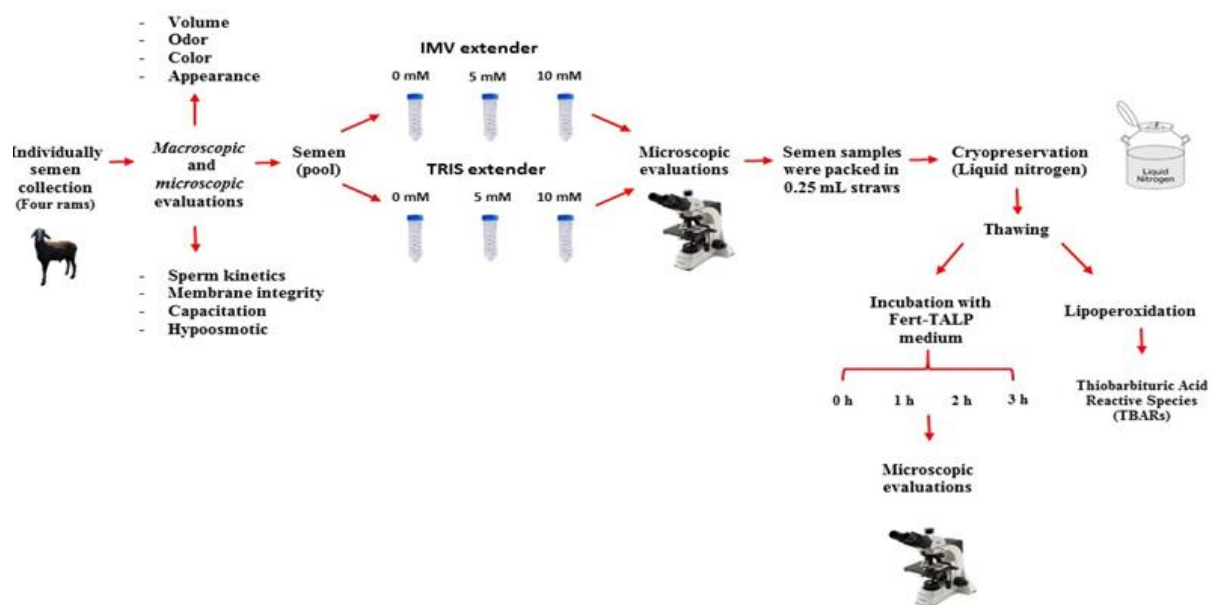
		1 h			2 h			3 h		
		0 mM LC*	5 mM LC*	10 mM LC*	0 mM LC*	5 mM LC*	10 mM LC*	0 mM LC*	5 mM LC*	10 mM LC*
Total motility (%)	IMV**	35.5 $\pm$ 18.8 ^{Aa}	30.4 $\pm$ 1.0 ^{Aa}	23.1 $\pm$ 3.6 ^{Aa}	22.2 $\pm$ 7.8 ^{Aa}	25.2 $\pm$ 3.1 ^{Aa}	40.4 $\pm$ 20.8 ^{Aa}	27.7 $\pm$ 13.6 ^{Aa}	30.8 $\pm$ 19.4 ^{Aa}	32.2 $\pm$ 19.3 ^{Aa}
	TRIS**	37.9 $\pm$ 10.9 ^{Aa}	28.3 $\pm$ 4.1 ^{Aa}	23.1 $\pm$ 4.1 ^{Aa}	38.3 $\pm$ 16.0 ^{Aa}	37.1 $\pm$ 12.1 ^{Aa}	28.4 $\pm$ 6.3 ^{Aa}	18.6 $\pm$ 8.7 ^{Aa}	42.2 $\pm$ 21.0 ^{Aa}	28.2 $\pm$ 4.8 ^{Aa}
Fast sperm (%)	IMV	1.9 $\pm$ 1.1 ^{Aa}	5.6 $\pm$ 5.9 ^{Aa}	2.5 $\pm$ 0.9 ^{Aa}	2.1 $\pm$ 1.9 ^{Aa}	4.0 $\pm$ 2.3 ^{Aa}	6.6 $\pm$ 5.0 ^{Aa}	4.5 $\pm$ 5.6 ^{Aa}	8.2 $\pm$ 9.9 ^{Aa}	3.6 $\pm$ 3.8 ^{Aa}
	TRIS	4.0 $\pm$ 2.4 ^{Aa}	3.3 $\pm$ 0.7 ^{Aa}	1.9 $\pm$ 1.6 ^{Aa}	5.0 $\pm$ 4.9 ^{Aa}	6.8 $\pm$ 4.4 ^{Aa}	2.0 $\pm$ 0.8 ^{Aa}	1.1 $\pm$ 0.7 ^{Aa}	2.4 $\pm$ 2.5 ^{Aa}	1.9 $\pm$ 0.6 ^{Aa}
Medium sperm (%)	IMV	3.0 $\pm$ 2.4 ^{Aa}	3.5 $\pm$ 2.3 ^{Aa}	1.4 $\pm$ 0.8 ^{Aa}	1.0 $\pm$ 0.6 ^{Aa}	1.7 $\pm$ 0.9 ^{Aa}	3.2 $\pm$ 1.5 ^{Aa}	1.8 $\pm$ 0.9 ^{Aa}	2.3 $\pm$ 2.1 ^{Aa}	2.2 $\pm$ 1.5 ^{Aa}
	TRIS	1.7 $\pm$ 1.2 ^{Aa}	2.5 $\pm$ 1.8 ^{Aa}	1.6 $\pm$ 0.4 ^{Aa}	1.6 $\pm$ 1.0 ^{Aa}	2.4 $\pm$ 1.3 ^{Aa}	3.1 $\pm$ 0.8 ^{Aa}	0.9 $\pm$ 0.7 ^{Aa}	0.8 $\pm$ 0.4 ^{Aa}	1.2 $\pm$ 0.7 ^{Aa}
Slow sperm (%)	IMV	18.6 $\pm$ 2.4 ^{Aa}	24.7 $\pm$ 8.6 ^{Aa}	18.4 $\pm$ 2.6 ^{Aa}	19.1 $\pm$ 6.1 ^{Aa}	19.6 $\pm$ 1.8 ^{Aa}	30.5 $\pm$ 16.4 ^{Aa}	21.4 $\pm$ 8.3 ^{Aa}	20.4 $\pm$ 7.9 ^{Aa}	26.3 $\pm$ 14.4 ^{Aa}
	TRIS	36.2 $\pm$ 7.5 ^{Ba}	21.3 $\pm$ 9.8 ^{Aa}	20.0 $\pm$ 8.1 ^{Aa}	31.6 $\pm$ 17.9 ^{Aa}	27.9 $\pm$ 10.5 ^{Aa}	22.0 $\pm$ 6.0 ^{Aa}	21.7 $\pm$ 10.8 ^{Aa}	36.3 $\pm$ 16.3 ^{Aa}	24.0 $\pm$ 3.0 ^{Aa}
VCL (μ m/s)***	IMV	30.1 $\pm$ 5.2 ^{Aa}	48.1 $\pm$ 22.5 ^{Aa}	29.5 $\pm$ 3.0 ^{Aa}	27.9 $\pm$ 6.9 ^{Aa}	43.4 $\pm$ 12.8 ^{Aa}	38.3 $\pm$ 10.4 ^{Aa}	34.9 $\pm$ 18.2 ^{Aa}	42.0 $\pm$ 22.0 ^{Aa}	29.4 $\pm$ 7.1 ^{Aa}
	TRIS	30.0 $\pm$ 12.2 ^{Aa}	35.7 $\pm$ 10.2 ^{Aa}	29.0 $\pm$ 7.7 ^{Aa}	36.1 $\pm$ 15.9 ^{Aa}	44.1 $\pm$ 4.5 ^{Aa}	31.7 $\pm$ 3.9 ^{Aa}	37.7 $\pm$ 19.5 ^{Aa}	28.3 $\pm$ 9.0 ^{Aa}	23.6 $\pm$ 2.5 ^{Aa}
VAP (μ m/s)***	IMV	113.3 $\pm$ 106.0 ^{Aa}	38.2 $\pm$ 23.5 ^{Aa}	19.8 $\pm$ 2.6 ^{Aa}	18.5 $\pm$ 7.3 ^{Aa}	34.6 $\pm$ 13.6 ^{Aa}	28.7 $\pm$ 10.0 ^{Aa}	27.9 $\pm$ 18.9 ^{Aa}	32.3 $\pm$ 24.3 ^{Aa}	20.2 $\pm$ 10.4 ^{Aa}
	TRIS	31.2 $\pm$ 5.7 ^{Aa}	26.8 $\pm$ 9.6 ^{Aa}	21.1 $\pm$ 8.1 ^{Aa}	30.8 $\pm$ 13.9 ^{Aa}	38.1 $\pm$ 4.9 ^{Aa}	25.7 $\pm$ 4.6 ^{Aa}	32.0 $\pm$ 18.7 ^{Aa}	23.1 $\pm$ 10.6 ^{Aa}	18.3 $\pm$ 4.6 ^{Aa}
VSL (μ m/s)***	IMV	15.1 $\pm$ 4.2 ^{Aa}	32.1 $\pm$ 23.2 ^{Aa}	15.1 $\pm$ 2.9 ^{Aa}	13.9 $\pm$ 6.8 ^{Aa}	27.8 $\pm$ 14.6 ^{Aa}	23.0 $\pm$ 8.9 ^{Aa}	23.4 $\pm$ 17.2 ^{Aa}	27.0 $\pm$ 23.0 ^{Aa}	16.1 $\pm$ 10.0 ^{Aa}
	TRIS	26.6 $\pm$ 5.5 ^{Ba}	21.6 $\pm$ 8.9 ^{Aa}	16.4 $\pm$ 7.7 ^{Aa}	26.9 $\pm$ 13.0 ^{Aa}	30.5 $\pm$ 8.0 ^{Aa}	21.9 $\pm$ 5.3 ^{Aa}	27.7 $\pm$ 17.1 ^{Aa}	19.6 $\pm$ 10.5 ^{Aa}	13.8 $\pm$ 4.5 ^{Aa}
ALH (μ m/s)***	IMV	1.7 $\pm$ 0.3 ^{Aa}	2.0 $\pm$ 0.5 ^{Aa}	2.1 $\pm$ 0.4 ^{Ba}	1.7 $\pm$ 0.6 ^{Aa}	1.8 $\pm$ 0.2 ^{Aa}	1.8 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	1.5 $\pm$ 0.2 ^{Aa}	1.5 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	1.2 $\pm$ 0.4 ^{Aa}
	TRIS	6.5 $\pm$ 9.0 ^{Ab}	1.9 $\pm$ 0.3 ^{Aab}	1.4 $\pm$ 0.2 ^{Aa}	1.5 $\pm$ 0.6 ^{Aa}	1.7 $\pm$ 0.2 ^{Aa}	1.6 $\pm$ 0.3 ^{Aa}	1.7 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	1.7 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	1.5 $\pm$ 0.2 ^{Aa}
STR (%)***	IMV	77.1 $\pm$ 5.9 ^{Aa}	76.5 $\pm$ 5.9 ^{Aa}	74.0 $\pm$ 3.3 ^{Aa}	72.8 $\pm$ 10.8 ^{Aa}	77.3 $\pm$ 12.9 ^{Aa}	77.2 $\pm$ 2.5 ^{Aa}	85.8 $\pm$ 5.4 ^{Aa}	77.9 $\pm$ 10.1 ^{Aa}	73.5 $\pm$ 15.7 ^{Aa}
	TRIS	85.1 $\pm$ 2.5 ^{Aa}	82.5 $\pm$ 8.0 ^{Aa}	84.1 $\pm$ 6.5 ^{Aa}	85.2 $\pm$ 1.4 ^{Aa}	86.4 $\pm$ 4.8 ^{Aa}	87.6 $\pm$ 1.6 ^{Ba}	84.1 $\pm$ 6.4 ^{Aa}	88.0 $\pm$ 0.9 ^{Aa}	74.5 $\pm$ 10.0 ^{Aa}
BCF (Hz)***	IMV	6.2 $\pm$ 1.2 ^{Aa}	7.4 $\pm$ 0.9 ^{Aa}	6.3 $\pm$ 1.0 ^{Aa}	5.2 $\pm$ 1.1 ^{Aa}	6.2 $\pm$ 0.5 ^{Aa}	6.7 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	6.0 $\pm$ 1.7 ^{Aa}	4.7 $\pm$ 2.3 ^{Aa}	4.7 $\pm$ 2.4 ^{Aa}
	TRIS	7.8 $\pm$ 0.3 ^{Aa}	6.9 $\pm$ 0.4 ^{Aa}	7.0 $\pm$ 0.7 ^{Aa}	6.4 $\pm$ 1.5 ^{Aa}	6.5 $\pm$ 1.0 ^{Aa}	6.4 $\pm$ 0.9 ^{Aa}	6.6 $\pm$ 0.6 ^{Aa}	6.6 $\pm$ 0.3 ^{Aa}	6.2 $\pm$ 1.4 ^{Aa}
LIN (%)***	IMV	49.7 $\pm$ 6.4 ^{Aa}	54.2 $\pm$ 9.7 ^{Aa}	53.3 $\pm$ 10.6 ^{Aa}	47.4 $\pm$ 12.6 ^{Aa}	60.9 $\pm$ 16.0 ^{Aa}	59.1 $\pm$ 12.4 ^{Aa}	61.5 $\pm$ 18.6 ^{Aa}	55.4 $\pm$ 22.3 ^{Aa}	50.6 $\pm$ 25.0 ^{Aa}
	TRIS	72.6 $\pm$ 6.4 ^{Ba}	66.0 $\pm$ 17.9 ^{Aa}	70.0 $\pm$ 12.7 ^{Aa}	73.6 $\pm$ 7.9 ^{Ba}	74.7 $\pm$ 8.6 ^{Aa}	74.1 $\pm$ 1.8 ^{Ba}	69.3 $\pm$ 10.6 ^{Aab}	76.7 $\pm$ 3.7 ^{Ab}	53.6 $\pm$ 14.5 ^{Aa}
WOB (%)***	IMV	65.7 $\pm$ 5.5 ^{Aa}	75.0 $\pm$ 12.7 ^{Aa}	69.6 $\pm$ 9.6 ^{Aa}	64.4 $\pm$ 9.5 ^{Aa}	77.9 $\pm$ 8.2 ^{Aa}	74.4 $\pm$ 11.8 ^{Aa}	75.0 $\pm$ 13.7 ^{Aa}	69.4 $\pm$ 19.5 ^{Aa}	65.0 $\pm$ 23.1 ^{Aa}
	TRIS	85.3 $\pm$ 5.7 ^{Ba}	79.0 $\pm$ 14.1 ^{Aa}	82.8 $\pm$ 8.2 ^{Aa}	85.1 $\pm$ 7.0 ^{Ba}	88.6 $\pm$ 2.0 ^{Aa}	84.6 $\pm$ 2.4 ^{Aa}	82.0 $\pm$ 7.2 ^{Aab}	87.2 $\pm$ 4.4 ^{Ab}	71.0 $\pm$ 10.1 ^{Aa}
PM integrity (%)***	IMV	4.7 $\pm$ 5.4 ^{Aa}	4.9 $\pm$ 4.1 ^{Aa}	2.7 $\pm$ 1.1 ^{Aa}	1.9 $\pm$ 1.7 ^{Aa}	6.4 $\pm$ 5.6 ^{Aa}	8.1 $\pm$ 6.4 ^{Aa}	3.9 $\pm$ 4.1 ^{Aa}	3.2 $\pm$ 3.1 ^{Aa}	2.8 $\pm$ 2.1 ^{Aa}
	TRIS	1.5 $\pm$ 0.7 ^{Aa}	1.8 $\pm$ 1.8 ^{Aa}	3.2 $\pm$ 2.6 ^{Aa}	2.0 $\pm$ 1.2 ^{Aa}	1.7 $\pm$ 0.6 ^{Aa}	2.6 $\pm$ 2.5 ^{Aa}	3.4 $\pm$ 3.3 ^{Aa}	2.8 $\pm$ 1.7 ^{Aa}	2.9 $\pm$ 2.1 ^{Aa}

- 1 Within a column, values with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).
- 2 a,b differ among groups treated with different concentrations of LC (0, 5, 10 mM) and at the same moment (during incubation).
- 3 A,B differ between extenders (IMV vs. TRIS) at the same moment (during incubation) and at the same concentration of LC (0, 5, 10 mM).
- 4 *Concentrations of L-carnitine (Sigma C0158) used (either 0, 5 or 10 mM) in the semen extender for cryopreservation.
- 5 ** Extenders: IMV: OptiXcell™; TRIS egg yolk [31].
- 6 *** VCL: curvilinear velocity; VAP: average path velocity; VSL: straight-line velocity; ALH: amplitude of lateral head displacement; STR:
- 7 straightness; BCF: beat/cross frequency; LIN: linearity; WOB: wobble; PM integrity: plasma membrane integrity.
- 8

Figure captions

Figure 1. Experimental design of the study. Effect of different concentrations of L-carnitine (0, 5, 10 mM) in extender (either TRIS or IMV) for semen cryopreservation of ram sperm, during incubation of 3 h at 38 °C in 5% CO₂.

Figure 2. Capacitation status of ram sperm: A) immediately after freezing-thawing (0 h) and during incubation moments, B) 1 h, C) 2 h and D) 3 h. Sperm was frozen using different extenders (IMV or TRIS) and concentrations (0, 5 and 10 mM) of L-carnitine (LC) (Sigma C0158). A,B differ significantly between extenders (IMV vs. TRIS) at the same moment (during incubation) and at the same concentration of LC. a,b differ significantly among groups treated with different concentrations of LC and at the same moment (during incubation).



1

2 Figure 1

3

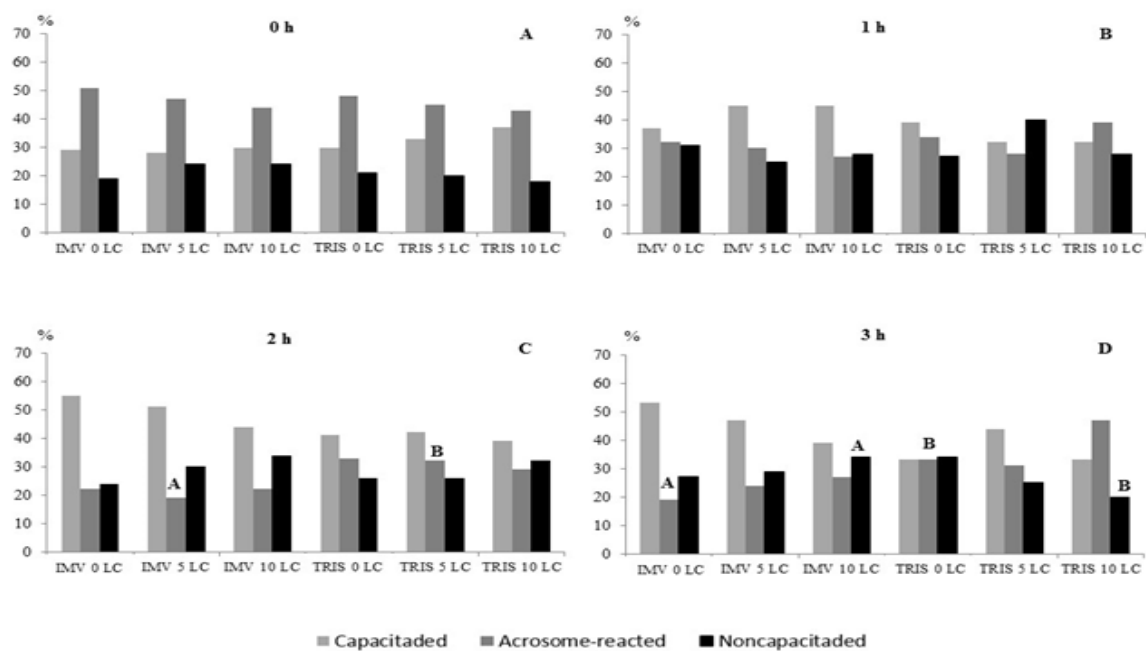


Figure 2

1 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

2 A hipótese de que a suplementação com LC poderia afetar positivamente a
3 viabilidade espermática pós-descongelamento em ovinos e na sua longevidade,
4 especialmente no meio comercial sem a presença de gema de ovo (que
5 naturalmente contém alta quantidade de antioxidante). No geral, nossa hipótese não
6 pode ser apoiada no estudo atual, uma vez que o efeito da LC foi aleatório, ou seja,
7 não afetou consistentemente nenhum grupo em nenhuma concentração usada.
8 Embora a LC tenha afetado alguns parâmetros isolados, sua suplementação no
9 diluidor de sêmen não apresentou um efeito benéfico consistente no
10 espermatozóide pós - descongelamento e durante toda a incubação por até 3 horas,
11 independentemente do diluente utilizado. O diluente comercial optiXcell TM IMV
12 comprometeu a cinética espermática e apresentou maior estresse oxidativo
13 comparado ao diluente TRIS. Nossas descobertas fornecem uma plataforma para
14 investigar e elaborar protocolos para testar os efeitos benéficos da suplementação
15 da LC em sêmen de carneiro criopreservado.

16

17

18

19

20

21

22

23

1 7. Referências Bibliográficas

- 2 ARAÚJO-LEMO, P. F. B. et al. Comparison of different cryoprotectant regimes for
3 vitrification of ovine embryos produced *in vivo*. *Small Ruminant Research*, v. 119, n. 1-3, p.
4 100-106, 2014.
- 5 ARRUDA, RP. et al. Nutraceuticals in reproduction of bulls and stallions. R. Bras.
6 Zootec, 39, 393-400, 2010.
- 7 BARBAS, JP, Mascarenhas, RD. Cryopreservation of domestic animal sperm cells.
8 Cell Tissue Bank, 10, 49-62, 2009.
- 9 BAGHAEI, A. et al. Molecular and biochemical evidence on the protection of cardiomyocytes
10 from phosphine-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunction and apoptosis by
11 acetyl-L-carnitine. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 42, p. 30-37, 2016.
- 12 BALDOCEDA, L. et al. Genetic influence on the reduction in bovine embryo lipid content by
13 L-carnitine. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 28, n. 8, p. 1172-1184, 2015.
- 14 BAVARI, M. et al. Neuroprotective, antiapoptotic and antioxidant effects of L-carnitine
15 against caffeine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cell line. *Drug and*
16 *Chemical Toxicology*, v. 39, n. 2, p. 157-166, 2016.
- 17 BIGGERS, J. D. et al. The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote.
18 *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 58, n. 2,
19 p. 560-567, 1967.
- 20 BORGES, JC. et al. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de
21 metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*,
22 35, 303-314, 2011.
- 23 BREMER, J. Carnitine – metabolism and functions. *Physiological Reviews*, v. 63, n. 4, p.
24 1420-1480, 1983.

- 1 BUCAK, M. N.; TEKIN, N. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on
2 the liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research*, v. 73, n. 1, p. 103–108,
3 2007
- 4 CALÒ, L. A. et al. Antioxidant effect of L-carnitine and its short chain esters: relevance for
5 the protection from oxidative stress related cardiovascular damage. *International Journal of*
6 *Cardiology*, v. 107, n. 1, p. 54-60, 2006.
- 7 CAO, Y. et al. Comparison of pharmacokinetics of L-carnitine, acetyl-L-carnitine and
8 propionyl-L-carnitine after single oral administration of L-carnitine in healthy volunteers.
9 *Clinical & Investigative Medicine*, v. 32, n. 1, p. 13-19, 2009.
- 10 CHAN, D. C. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell*, v.
11 125, n. 7, p. 1241-1252, 2006.
- 12 CHANKITISAKUL, V. et al. Supplementation of maturation medium with L-carnitine
13 improves cryo-tolerance of bovine in vitro matured oocytes. *Theriogenology*, v. 79, n. 4, p.
14 590-598, 2013.
- 15 COELHO, C.F. et al. Aplicações clínicas da suplementação de L-carnitina. *Revista*
16 *de Nutrição*. Pontifícia Universidade Católica de Campinas, v. 18, n. 5, p. 651-659,
17 2005.
- 18 CSEH S, Faigl V, Amiridis GS. Semen processing and artificial insemination in
19 health management of small ruminants. *Anim Reprod Sci*. 2012 Feb;130(3-4):187-
20 92.
- 21 COLLINS, J. A. et al. Oxidative stress promotes peroxiredoxin hyperoxidation and
22 attenuates pro-survival signaling in aging chondrocytes. *The Journal of Biological*
23 *Chemistry*, v.291, n. 13, p. 6641-6654, 2016.
- 24 CONLON, T. M. et al. Metabolomics screening identifies reduced L-carnitine to be
25 associated with progressive emphysema. *Clinical Science*, v. 130, n. 4, p. 273-287, 2016.

- 1 DAVIES, M. N. et al. The acetyl group buffering action of carnitine acetyltransferase offsets
2 macronutrient-induced lysine acetylation of mitochondrial proteins. *Cell Reports*, v. 14, n. 2,
3 p. 243-254, 2016.
- 4 DALCIN, L.; LUCCI, C. M. Criopreservação de embriões de animais de produção: princípios
5 criobiológicos e estado atual. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 34, n. 3, p. 149-
6 159, 2010.
- 7 DU PLESSIS, S. S. et al. Impact of oxidative stress on IVF. *Expert Review of Obstetrics &*
8 *Gynecology*, v. 3, n. 4, p. 539-554, 2008.
- 9 DUNNING, K. R. et al. Increased beta-oxidation and improved oocyte developmental
10 competence in response to L-carnitine during ovarian in vitro follicle development in mice.
11 *Biology of Reproduction*, v. 85, n. 3, p. 548-555, 2011.
- 12 DUNNING, K. R.; ROBKER, R. L. Promoting lipid utilization with L-carnitine to improve
13 oocyte quality. *Animal Reproduction Science*, v. 134, n. 1-2, p. 69-75, 2012.
- 14
15 EATON, S. Control of mitochondrial β -oxidation flux. *Progress in Lipid Research*, v. 41, n.
16 3, p. 197-239, 2002.
- 17 EATON, S.; BARTLETT, K.; POURFARZAM, M. Mammalian mitochondrial β -oxidation.
18 *Biochemical Journal*, v. 320, pt. 2, p. 345-357, 1996.
- 19 EVANS, G, Maxwell, W. Salamon's artificial insemination of sheep and goats.
20 Butterworth, Sydney, p. 19, 1987.
- 21 FLANAGAN, J. L. Role of carnitine in disease. *Nutrition & Metabolism*, v. 7, n. 30, p. 1-14,
22 2010.
- 23 GARCÍA-MIRANDA, P. et al. Developmental maturation and segmental distribution of rat
24 small intestinal L-carnitine uptake. *The Journal of Membrane Biology*, v. 206, n. 1, p. 9-16,
25 2005.

1 GENOVA, M. L. et al. The mitochondrial production of reactive oxygen species in relation to
2 aging and pathology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1011, p. 86-100,
3 2004.

4 HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstratation of cytochrome c
5 oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or
6 induced by stress. *International Journal of Andrology*, 19, 809-828, 1987.

7 JAKOBS, B. S.; WANDERS, R. J. A. Fatty acid β -oxidation in peroxisomes and
8 mitochondria: the first, unequivocal evidence for the involvement of carnitine in
9 shuttling propionyl-CoA from peroxisomes to mitochondria. *Biochemical and*
10 *Biophysical Research Communications*, v. 213, n. 3, p. 1035-1041, 1995.

11
12 JANG, H. H. et al. Two enzymes in one: two yeast peroxiredoxin display oxidative
13 stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function.
14 *Cell*, v. 117, n. 5, p. 625-635, 2004.

15
16 JIANG, Q. et al. Changes in the levels of l-carnitine, acetyl-l-carnitine and propionyl-
17 l-carnitine are involved in perfluorooctanoic acid induced developmental
18 cardiotoxicity in chicken embryo. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.
19 48, p. 116-124, 2016. Disponível em: <10.1016/j.etap.2016.10.01>

20
21 JOGL, G.; TONG, L. Crystal structure of carnitine acetyltransferase and implications
22 for the catalytic mechanism and fatty acid transport. *Cell*, v. 112, n. 1, p.113-122,
23 2003.

24
25 KERNER, J; HOPPEL, C. Fatty acid import to mitochondria. *Biochimica et*
26 *Biophysica Acta*, v. 1486, n. 1, p. 1-17, 2000.

27
28 KUNAK, C. S. et al. Nephroprotective potential of carnitine against glycerol and
29 contrast-induced kidney injury in rats through modulation of oxidative stress,
30 proinflammatory cytokines, and apoptosis. *The British Journal of Radiology*, v. 89,
31 n. 1058, 2015.

32 KUNAK, C. S. et al. Nephroprotective potential of carnitine against glycerol and
33 contrast-induced kidney injury in rats through modulation of oxidative stress,
34 proinflammatory cytokines, and apoptosis. *The British Journal of Radiology*, v. 89,
35 n. 1058, 2015.

- 1 LI, J-L. et al. Effects of L-carnitine against oxidative stress in human hepatocytes:
2 involvement of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Journal of*
3 *Biomedical Science*, v. v. 19, p. 1-9, 2012.
- 4 MAIA, MS, Bicudo, SD. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em
5 mamíferos: uma revisão. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 33, 183-193, 2009.
- 6 MARCOVINA, S. M. et al. Translating the basic knowledge of mitochondrial functions
7 to metabolic therapy: role of L-carnitine. *Translational Research*, v. 161, n. 2, p. 73-
8 84, 2013.
- 9 McGARRY, J. D.; BROWN, N. F. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase
10 system. From concept to molecular analysis. *European Journal of Biochemistry*, v.
11 244, n. 1, p. 1-14, 1997.
- 12 MISHRA, A. et al. L-carnitine mediated reduction in oxidative stress and alteration in
13 transcript level of antioxidant enzymes in sheep embryos produced in vitro.
14 *Reproduction in Domestic Animals*, v. 51, n. 2, p. 311-321, 2016.
- 15 MOAWAD, A. R. et al. L-carnitine supplementation during vitrification of mouse
16 germinal vesicle stage-oocytes and their subsequent in vitro maturation improves
17 meiotic spindle configuration and mitochondrial distribution in metaphase II oocytes.
18 *Human Reproduction*, v. 29, n. 10, p. 2256-2268, 2014.
- 19 NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger: Principles of Biochemistry*. 5. ed. Nova
20 Iorque: W. H. Freeman and Company, 2008. 1302 p.
- 21 NOLAND, R. C. et al. Carnitine insufficiency caused by aging and overnutrition
22 compromises mitochondrial performance and metabolic control. *The Journal of*
23 *Biological Chemistry*, v. 284, n. 34, p. 22840-22852, 2009.
- 24 OTT, M. et al. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, v. 12, n. 5,
25 p. 913-922, 2007.

- 1 PANDE, S. V.; BLANCHER, M. C. Reversible inhibition of mitochondrial adenosine
2 diphosphate phosphorylation by long chain acyl coenzyme A esters. *The Journal of*
3 *Biological Chemistry*, v. 246, n. 2, p. 402-411, 1971.
- 4 PÉREZ, L. J. et al. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated
5 capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology*, v. 46,
6 n. 1, p. 131–140, 1996.
- 7 PRICKETT, R. C. et al. Effect of supercooling and cell volume on intracellular ice
8 formation. *Cryobiology*, v. 70, n. 2, p. 156-163, 2015.
- 9 PUDDU, P. et al. The putative role of mitochondrial dysfunction in hypertension.
10 *Clinical and Experimental Hypertension*, v. 29, n. 7, p. 427-434, 2007.
- 11
12 RAMSAY, R.; ARDUINI, A. The carnitine acyltransferases and their role in
13 modulating acyl-CoA pools. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 302, n. 2,
14 p. 307-314, 1993.
- 15
16 RAMSAY, R. R. et al. Molecular enzymology of carnitine transfer and transport.
17 *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1546, n. 1, p. 21-43, 2001.
- 18 RAMSAY, R. R; ZAMMIT, V. A. Carnitine acyltransferases and their influence on
19 CoA pools in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 25, n. 5-6, p.
20 475-493, 2004.
- 21 ROY, V. K.; VERMA, R.; KRISHNA, A. Carnitine-mediated antioxidant enzyme
22 activity and Bcl2 expression involves peroxisome proliferator-activated receptor- γ
23 coactivator-1 α in mouse testis. *Reproduction, Fertility and Development*, 2016.
- 24 SALAMON, S, Maxwell, WM. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*,
25 62, 77–111, 2000.
- 26 SEILER, S. E. et al. Carnitine acetyltransferase mitigates metabolic inertia and
27 muscle fatigue during exercise. *Cell Metabolism*, v. 22, n. 1, p. 65-76, 2015.

- 1 SHARMA, S. et al. Altered carnitine homeostasis is associated with decreased
2 mitochondrial function and altered nitric oxide signalling in lambs with pulmonary
3 hypertension. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular*, v. 294,
4 n. 1, p. L46-56, 2008.
5
- 6 SHARMA, S. et al. Role of carnitine acetyl transferase in regulation of nitric oxide
7 signaling in pulmonary arterial endothelial cells. *International Journal of Molecular*
8 *Sciences*, v. 14, n. 1, p. 255-272, 2013.
- 9 SOMFAI, T. et al. Enhancement of lipid metabolism with L-carnitine during in vitro
10 maturation improves nuclear maturation and cleavage ability of follicular porcine
11 oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 23, n. 7, p. 912-920, 2011.
- 12 SUN, Y.; RIGAS, B. The thioredoxina system mediates redox-induced cell death in
13 human colon cancer cells: implications for the mechanism of action of anticancer
14 agents. *Cancer Research*, v. 68, n. 20, p. 8269-8277, 2008.
- 15 VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal*
16 *Reproduction Science*, v. 60-61, p. 357-364, 2000.
- 17 VAZ, F. M.; WANDERS, R. J. A. Carnitine byosynthesis in mammals. *Biochemical*
18 *Journal*, v. 361, pt. 3, p. 417-429, 2002.
- 19 YÁÑIZ, J. L. et al. Comparison of membrane-permeant fluorescent probes for sperm
20 viability assessment in the ram. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*,
21 v. 48, n. 4, p. 598–603, 2013.
- 22 WANG, Q. et al. Effects of L-carnitine against H₂O₂-induced oxidative stress in
23 grass carp ovary cells (*Ctenopharyngodon idellus*). *Fish Physiology and*
24 *Biochemistry*, v. 42, n. 3, p. 845-857, 2016.
- 25 ZAMMIT, V. A. Carnitine acyltransferases: functional significance of subcellular
26 distribution and membrane topology. *Progress in Lipid Research*, v. 38, n. 3, p. 199-
27 224, 1999.

- 1 ZHANG, D. X.; GUTTERMAN, D. D. Mitochondrial reactive oxygen species-
2 mediated signaling in endothelial cells. *American Journal of Physiology. Heart and*
3 *Circulatory Physiology*, v. 292, n. 5, p. 2023-2031, 2007.

4

5

6

7

8

8. ANEXO

- Composição do meio Tris-Gema:

Tris 3,634g

Glicose 0,50g

Ácido cítrico

Gema de ovo 15mL

Penicilina Potássica 100.000UI

Glicerol 10mL

Estreptomicina 0,100g

Água destilada qsp 100mL

Fonte: Salamon & Maxwell (2000)