



**MARINA BOTTREL REIS NOGUEIRA**

**EFEITOS DA ADIÇÃO *IN VITRO* DE  
AMINOÁCIDOS NA QUALIDADE SEMINAL DE  
ASNOS ANDALUZES APÓS O  
DESCONGELAMENTO**

**LAVRAS – MG**

**2017**

**MARINA BOTTREL REIS NOGUEIRA**

**EFEITOS DA ADIÇÃO IN VITRO DE AMINOÁCIDOS NA  
QUALIDADE SEMINAL DE ASNOS ANDALUZES APÓS O  
DESCONGELAMENTO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. José Camisão de Souza

Orientador

Prof. Dr. Jesús Manuel Dorado Martín

Coorientador

**LAVRAS – MG**

**2017**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Nogueira, Marina Bottrel Reis.

Efeitos da adição *in vitro* de aminoácidos na qualidade seminal de  
asnos andaluzes após o descongelamento / Marina Bottrel Reis

Nogueira. - 2017.

93 p.

Orientador: José Camisão de Souza.

Coorientadores: Jesús Manuel Dorado Martín

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Espermatozoide. 2. Criopreservação. 3. Reprodução. I. Souza,  
José Camisão de. II. Martín, Jesús Manuel Dorado. III. Título.

**MARINA BOTTREL REIS NOGUEIRA**

**EFEITOS DA ADIÇÃO *IN VITRO* DE AMINOÁCIDOS NA QUALIDADE  
SEMINAL DE ASNOS ANDALUZES APÓS O DESCONGELAMENTO**

***EFFECTS OF THE IN VITRO ADDITON OF AMINO ACIDS ON  
ANDALUSIAN DONKEYS POST-THAW SPERM QUALITY***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 09 de fevereiro de 2017.

Profa. Dra. Daiane Moreira Silva IF-SM  
Profa. Dra. Raquel Silva de Moura UFLA  
Prof. Dr. Antonio Carlos Cunha Lacreta Júnior UFLA

Prof. Dr. José Camisão de Souza  
Orientador

Prof. Dr. Jesús Manuel Dorado Martín  
Coorientador

**LAVRAS – MG  
2017**

*A você, que me ensinou a jamais aceitar  
uma ideia pré-concebida sem antes refletir sobre ela.*

*Minha mãe, a você dedico!*

## AGRADECIMENTOS

Aos Animais, seres tão mais evoluídos que nós, aos quais não tenho nada que ensinar, simplesmente aprender.

À minha mãe e irmã Larissa por serem minha base em todos os momentos da minha vida. Por sofrerem comigo minhas perdas e celebrarem comigo toda e cada conquista.

Aos meus, avós Cacilda e José Alfredo, por terem enraizado em mim sua tradição equestre e agrícola. E por terem deixado a melhor herança que alguém pode receber: um nome de família digno e honrado.

Ao meu orientador, Dr. José Camisão de Souza, pela oportunidade, confiança e incentivos à vida acadêmica mesmo quando eu mesma não me sinto capaz.

*A mi tutor Dr Jesús Dorado por la enorme dedicación a mi desarrollo profesional. Por todas las horas y días de trabajo, estudios, consejos y proyectos. Por ser la persona y profesional que es, le tengo profunda admiración. Y sobretodo por la bonita amistad que me hemos construído desde la primera vez que trabajamos juntos, hace ya 12 años...*

Ao meu ex-marido Thomaz, por tudo que representou em minha carreira profissional. Juntos chegamos além do que eu jamais imaginei.

*A José Sanz Parejo (in memoriam), quien me trajo a España por primera vez tras muchas invitaciones, llevándome a su casa. Una de las personas más espectaculares que conocí, qué mucho aprendí de él.*

Aos membros da banca por todas as considerações, críticas e disponibilidade no aprimoramento deste trabalho.

Aos meus primos e tios que, mesmo distantes sempre estão presentes e me enchem de orgulho por ter uma família tão linda.

*A la Universidad de Córdoba y al Centro Rural Malpica por proporcionaren los animales, instalaciones y materiales para el desarrollo del proyecto de investigación.*

À UFLA e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pela oportunidade de realizar o doutorado.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos na Espanha por meio do PDSE.

## RESUMO

Os asnos e seus híbridos são animais versáteis, rústicos e totalmente adaptados às regiões de clima árido. Ainda que nacionalmente o rebanho asinino seja grande e expressivo, há escassos estudos dedicados à reprodução desta espécie. Na Europa, técnicas avançadas de reprodução assistida têm sido utilizadas como importantes ferramentas, na conservação de raças asininas, que se encontram em perigo de extinção, tais como as raças espanholas Andaluza e Zamorano-Leonesa. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da adição de aminoácidos (AA) ao meio crioprotetor na qualidade seminal pós-descongelamento de Asnos Andaluzes. No total, 18 ejaculados foram coletados, provenientes de seis asnos Andaluzes. Eram coletados dois asnos ao dia, as amostras de sêmen foram mescladas em pools (2 ejaculados por pool). Cada pool era dividido em dez alíquotas criopreservadas com Gent A<sup>®</sup> com 1% de etilenoglicol (Gent-EG), suplementado com 0 (tratamento controle), 20, 40, ou 60 mM de glutamina, prolina ou taurina. Em todos os protocolos, tanto o sêmen fresco como o descongelado foram analisados, para motilidade, morfologia, integridade de acrossoma e integridade de membrana plasmática. O índice de fragmentação de DNA foi avaliado, dinamicamente, em amostras descongeladas. O uso da maior concentração (60 mM) dos aminoácidos glutamina e taurina resultou em melhores parâmetros de motilidade ( $P < 0.001$ ). A adição de glutamina, prolina e taurina não melhorou ( $P > 0.05$ ) os resultados de morfologia espermática (Oldenhof et al.) e de integridade de membrana (MIS), comparando-se às amostras controle. O ganho ( $P < 0.05$ ) foi observado, na integridade de acrossoma (AIS), empregando-se 60 mM de glutamina. Após descongelamento, não houve efeito significativo ( $P > 0.05$ ), na preservação do DNA espermático entre os tratamentos. Entretanto, às 6 h de incubação a 37°C, as amostras adicionadas de 60 mM de glutamina e 40 mM de taurina apresentaram menor sDFI ( $P < 0.05$ ) que as amostras controle. Às 24 h de incubação, os valores de sDFI foram inferiores ( $P < 0.05$ ), em todos os grupos suplementados com aminoácidos, em comparação com o grupo controle, com exceção somente para 20 mM de prolina. Conclui-se que a suplementação do crioprotetor Gent-EG com glutamina ou taurina, na concentração de 60 mM, incrementa a qualidade seminal pós-descongelamento em asnos.

**Palavras-chave:** Espermatozoide. Criopreservação. Reprodução. Equideocultura. Inseminação artificial.



## ABSTRACT

The donkeys and their hybrids are versatile animals, rustic and totally adapted to the regions of arid climate. Although nationally the herd is large and expressive, there are scarce studies dedicated to the reproduction of this species. In Europe, advanced assisted reproduction techniques have been used as important tools in the conservation of endangered asinine breeds such as the Spanish Andalusian and Zamorano-Leonesa donkey breeds. The aim of this study was to evaluate the effect of amino acid (AA) addition to the freezing medium on post-thaw quality of donkey semen. In total, 18 ejaculates were collected from six Andalusian donkeys. Two donkeys were collected per day, the two collected semen samples were mixed in pools (2 ejaculates per pool), divided into ten aliquots, and cryopreserved in Gent A<sup>®</sup> containing 1% ethylene glycol (Gent-EG) supplemented with 0 (as control), 20, 40, or 60 mM for each glutamine, proline, or taurine. Fresh and frozen-thawed semen samples were assessed for sperm motility, morphology, acrosome integrity and plasma membrane integrity. The DNA fragmentation index (sDFI) was dynamically accessed in the thawed samples. The high concentration (60 mM) of the amino acids glutamine and taurine resulted in greater ( $P<0.001$ ) post-thaw motility. The additives glutamine, proline and taurine did not improve ( $P>0.05$ ) the mean ASM and MIS values compared with the control samples, while improvement ( $P<0.05$ ) was observed at 60 mM for AIS when using glutamine. After thawing, there was no significant effect ( $P>0.05$ ) in DNA preservation between treatments. However, at 6 h of incubation, the samples added 60 mM glutamine and 40 mM taurine presented lower sDFI ( $P <0.05$ ) than the control samples. At 24 h, the sDFI values were lower ( $P<0.05$ ) in all supplemented groups than in control extender, except only for 20 mM proline. In conclusion, the supplementation of the Gent-EG extender with glutamine or taurine at concentrations of 60 mM improved post-thaw donkey sperm quality.

**Keywords:** Spermatozoa. Cryopreservation. Reproduction. Equideoculture. Artificial insemination.

## **LISTA DE FIGURAS**

### **PRIMEIRA PARTE**

Figura 1 – Asno Andaluz .....	19
-------------------------------	----

## LISTA DE TABELAS

### PRIMEIRA PARTE

Tabela 1 - Características espermáticas de 60 ejaculados coletados de 12 asnos andaluzes.....	22
---	----

### SEGUNDA PARTE – ARTIGO 1

Table 1. Osmotic pressure and pH values in the freezing extenders.....	91
Table 2. Mean values ( $\pm$ SEM) of sperm morphology, acrosome integrity, membrane integrity, and sperm motility evaluated by the Sperm Class Analyzer system, in three ejaculates collected from six Andalusian donkeys ( $n = 18$ ) and nine pooled semen samples of donkeys (two ejaculates per pool) of frozen-thawed semen in Gent <sup>®</sup> EG supplemented with different concentrations (0, 20, 40, or 60 mM) of glutamine (Glu), proline (Pro) and taurine (Tau) .....	92
Table 3. Mean ( $\pm$ SEM) DNA fragmentation index (sDFI) values associated with the extender treatments and regression analysis of sDFI vs. incubation time (immediately after thawing (T0) and after 6h (T6) and 24 h (T24) of incubation) .....	93

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Aminoácidos
AG	Ácidos graxos
AIS	Integridade de acrossoma (do inglês, <i>Acrosome-intact spermatozoa</i> )
ALH	Amplitude do deslocamento lateral da cabeça (do inglês, <i>amplitude of lateral head displacement</i> )
ASM	Morfologia espermática anormal (do inglês, <i>Abnormal sperm morphology</i> )
ATP	Adenosinatrifosfato
BCF	Frequência de batimento da cauda (do inglês, <i>beat cross frequency</i> )
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i> )
EG	Etilenoglicol
EO	Estresse oxidativo
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FDE	Fragmentação do DNA espermático
FFL	Fosfolipídeos
Gent-EG	Meio Gent® acrescentado de 1% de etilenoglicol
IA	Inseminação Artificial
LIN	linearidade (do inglês, <i>linearity</i> )
LN <sub>2</sub>	Nitrogênio líquido
MIS	Integridade de membrana (do inglês, <i>Membrane-intact spermatozoa</i> )
MT	Motilidade total (do inglês, <i>total motility</i> )
MP	Membrana plasmática
PG	Propilenoglicol
MP	Motilidade progressiva (do inglês, <i>progressive motility</i> )

ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês, <i>reactive oxygen species</i> )
sDFI	Índice de fragmentação do DNA espermático (do inglês, <i>sperm dynamic fragmental index</i> )
SEM	Erro padrão da média (do inglês, <i>standard error of the mean</i> )
SOD	Superóxido dismutase
STR	Rapidez (do inglês, <i>straightness</i> )
VAP	Velocidade média (do inglês, <i>average path velocity</i> )
VCL	Velocidade curvilínea (do inglês, <i>curvilinear velocity</i> )
VSL	Velocidade retilínea (do inglês, <i>straight line velocity</i> )
WOB	Oscilação (do inglês, <i>wobble</i> )

## LISTA DE SÍMBOLOS

mM	Milimois
n	Número absoluto
%	Porcentagem, por cento
®	Marca Registrada
™	Marca registrada (do inglês, <i>Trademark</i> )
M	Molar
μL	Micro litro(s)
μm	Micrometro (s)
°C	Graus Centígrados

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	15
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	19
<b>2.1</b>	<b>Asnos andaluzes</b> .....	19
<b>2.2</b>	<b>Características reprodutivas dos asnos e algumas comparações com garanhões</b> .....	21
<b>2.3</b>	<b>Membrana plasmática</b> .....	23
<b>2.4</b>	<b>Princípios da criopreservação</b> .....	24
<b>2.5</b>	<b>Estresse osmótico</b> .....	27
<b>2.6</b>	<b>Estresse oxidativo</b> .....	29
<b>2.7</b>	<b>Agentes crioprotetores</b> .....	30
<b>2.7.1</b>	<b>Etilenoglicol</b> .....	32
<b>2.8</b>	<b>Fragmentação do DNA espermático</b> .....	33
<b>2.9</b>	<b>Aminoácidos</b> .....	34
<b>2.9.1</b>	<b>Glutamina</b> .....	35
<b>2.9.2</b>	<b>Prolina</b> .....	36
<b>2.9.3</b>	<b>Taurina</b> .....	37
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	39
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	41
	<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGO</b> .....	57
	<b>ARTIGO 1 - USE OF TWO ALPHA AMINO ACIDS (GLUTAMINE AND PROLINE) AND 2-AMINOETHANESULFONIC ACID (TAURINE) TO IMPROVE DONKEY SEMEN CRYOPRESERVATION</b> .....	57

## **PRIMEIRA PARTE**

### **1 INTRODUÇÃO**

Em todo o mundo, historicamente, os asnos sempre estiveram presentes no ambiente rural como animais domesticados extremamente resistentes. A reprodução simples, objetivos de melhoramento específicos, as condições climáticas e o isolamento geográfico, todos estes fatores levaram ao desenvolvimento de grande diversidade, especialmente, no que se refere ao tamanho corporal. Ainda não há conhecimento de quantas raças asnais há na Europa e no mundo. Entretanto o avanço tecnológico deixou o asno redundante, e o burro, anteriormente tão comum e obíquo, começou a desaparecer, completamente, de vista. Mas com esse desaparecimento, uma parte importante do nosso patrimônio cultural está sendo perdida. Em toda a Andaluzia, o Asno Andaluz é conhecido como animal de esboço e obreiro, bem como adequado para reprodução de mulas, resistente ao calor e às doenças, cheio de energia com um temperamento calmo e equilibrado, entretanto, até o final da década de 1980, estava praticamente extinto.

O Brasil possui o maior rebanho de equídeos da América Latina e o terceiro maior do mundo. Dentre os equídeos, os asininos e seus híbridos são animais de extrema importância como animais de trabalho por se tratarem de animais rústicos, totalmente adaptados, às regiões de climas áridos e semiáridos. Estes animais versáteis são utilizados, em diversas funções e se destacam como animais de carga e tração, além de serem ótimos animais de montaria, possuindo cascos apropriados para o deslocamento em locais acidentados e pedregosos. Assim, tem ocorrido aumento do interesse no estudo das características reprodutivas destes animais, à medida que a economia se aquece e impulsiona a melhora genética de raças nacionais. A já consagrada raça nacional de jumentos Pêga fornece material genético, para a produção de híbridos, oriundos de



cruzamentos com éguas das raças Mangalarga Marchador, Mangalarga, Campolina, entre outras. Muares resultantes destes cruzamentos agradam aos usuários e criadores por serem animais cômodos, rústicos e de maior valor agregado.

O Brasil obtém lugar de destaque mundial, em produção científica e comercial no campo de biotecnologia da reprodução equina, entretanto, ainda que tenha grande e expressivo rebanho asinino, há escassos estudos dedicados à reprodução desta espécie. Isso se deve em parte ao fato de que os asininos pertencem ao mesmo grupo taxonômico dos cavalos, sendo considerados similares e tratados de forma equivalente. No entanto, apesar das semelhanças, há diferenças importantes quanto à reprodução destas duas espécies e se faz necessário o conhecimento específico de suas peculiaridades. Na Europa, técnicas avançadas de reprodução assistida têm sido utilizados como importantes ferramentas, na conservação de raças asininas, que se encontram em perigo de extinção tais como as raças espanholas Andaluza e Zamorano-Leonesa. No Brasil, investimentos em genética e em biotecnologias têm sido responsáveis por grande valorização de raças nacionais.

O uso de sêmen criopreservados, na inseminação artificial (IA), é a ferramenta mais efetiva de melhoramento genético na maioria dos animais domésticos. As vantagens do uso de sêmen congelado incluem menor gasto com transporte de doses, decréscimo no risco de transmissão de doenças venéreas e incremento do material genético, além de ser uma importante ferramenta, para a manutenção e integração das populações de raças asininas, em risco de extinção. Em despeito à alta qualidade seminal asinina pós- descongelamento e aos resultados aceitáveis em éguas, as taxas de concepção caem, drasticamente, quando se inseminam jumentas com sêmen de jumento criopreservado. Assim sendo, para aumentar as taxas gestacionais, em jumentas com sêmen congelado, com o intuito de alcançar índices reprodutivos aceitáveis, é necessário o estudo

de protocolos que possam melhorar os resultados, nesta espécie, tanto em qualidade seminal pós- descongelamento quanto em longevidade espermática.

O processo de congelar e descongelar o sêmen inclui fatores prejudiciais às células espermáticas como as variações de temperatura, osmolaridade, o estresse oxidativo, a formação dos cristais de gelo e a toxicidade advinda da exposição a agentes crioprotetores. Esses danos afetam a estrutura dos espermatozoides, provocando queda na longevidade seminal, no trato genital feminino. Na espécie equina, diversos estudos já foram conduzidos com o fim de se estabelecer uma curva ótima para a criopreservação espermática desses animais. Entretanto, em asnos, escassos estudos foram realizados neste sentido e, ainda, não se alcançou um protocolo padrão de congelamento seminal nesta espécie. A adição de outros crioprotetores, como, por exemplo, aminoácidos, ao meio de congelamento, pode melhorar não somente a qualidade seminal pós-descongelamento, mas também a capacidade fertilizante desses espermatozoides. Contudo a disparidade de resultados de estudos prévios, em outras espécies, sugere um efeito específico, para cada espécie, dependendo não unicamente do tipo de aminoácido utilizado, mas também da concentração empregada. Não há estudos publicados sobre o uso de aminoácidos no meio crioprotetor seminal de asnos andaluzes.

Em um estudo prévio (ACHA et al., 2015), a equipe de pesquisa, em reprodução animal da Universidade de Córdoba, observou que o meio crioprotetor Gent<sup>®</sup> A (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany), suplementado com 1% (v:v) etilenoglicol (Gent-EG), apresentou os melhores resultados pós-descongelamento, em asnos andaluzes, quando compararam diversos crioprotetores. Logo o meio Gent-EG foi utilizado em nosso estudo como crioprotetor controle. Assim, objetivou-se comparar o efeito da suplementação do meio Gent-EG com diferentes concentrações (0, 20, 40 e 60 mM) de

glutamina, prolina e taurina na qualidade seminal de asnos andaluzes pós-descongelamento.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Asnos andaluzes

Os asnos andaluzes (*Equus asinus*) são uma raça autóctone espanhola, encontrada em Andaluzía e Extremadura, estados do Sudoeste espanhol. Difundidos, especialmente, nas regiões do rio Guadalquivir, Guajaroze e entre Genil e Baena. Não existe uma hipótese clara e definida, quanto ao tronco originário do qual procede, porém a mais generalizada é a de que o Asno Andaluz é um descendente do antigo asno egípcio. Essa extinta raça egípcia de alta estatura, é representante do *Equus Asinus somalensis* e, provavelmente, da Espanha há cerca de 3000 anos (WALTRAUD; GRUNENFELDER; BROXHAM, 2008). A ANCRAA, Associação Nacional de Criadores da Raza Asnal Andaluza, foi fundada em 2001. E, segundo a ANCRAA, suas características padrão são Altura: 1.46-1.55cm; Peso: 320-460 kg; Cor: rucia.

Figura 1 – Asno Andaluz.



Asno Dominó, um dos animais utilizados no experimento. Campeão nacional, considerado um bom exemplo de Asno Andaluz.

As raças asininas espanholas, incluindo a Andaluza, estão em sério risco de extinção, por seu pequeno tamanho populacional atual (DORADO et al., 2013), reflexo da decadência da cultura rural espanhola e crise nos sistemas de exploração agrícola e pecuária, o que se traduziu em um rápido descenso no número de exemplares e em sua variabilidade genética. Essa raça autóctone andaluza foi utilizada por séculos em cruzamentos híbridos e seus produtos (mulas e burros) empregados no trabalho de campo (GALISTEO et al., 1998). Como estes animais híbridos são estéreis, tais cruzamentos acabam por comprometer a reprodução e preservação genética da raça (VIDAMENT et al., 2009). De acordo com o último censo elaborado pela Food and Agriculture Organization (FAO), a raça asnal andaluza conta, atualmente, com 749 indivíduos, dos quais somente 94 animais são considerados de alto valor genético (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2015). Por esses dados, a raça asnal andaluza está hoje catalogada como raça autóctone espanhola em perigo de extinção (*Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España, BOE 23/2009, RD 2129/2008, 26 de diciembre*).

A diversidade biológica é a chave para a manutenção da vida tal como a conhecemos agora, sendo um aspecto fundamental a conservação de pequenas populações (TAMARGO et al., 2009). Segundo Ojasti (1993), cada espécie, produto de uma larga evolução, tem um valor intrínseco por suas características únicas e, em seu conjunto, formam parte do patrimônio natural universal. Considerando a importância da biodiversidade e a preservação das pesquisas, nas espécies domésticas, a criação de bancos de sêmen das raças asnais atuais é necessária (ROTA et al., 2012). Em virtude da situação atual da raça de Asnos Andaluzes, é necessário o desenvolvimento de metodologias que melhorem a qualidade na criopreservação espermática desses animais (ACHA et al., 2015).

## **2.2 Características reprodutivas dos asnos e algumas comparações com garanhões**

Apesar de apresentarem similaridades com garanhões, há peculiaridades, nas características reprodutivas de jumentos, que não devem ser desprezadas. Com relação aos órgãos reprodutores, testículos e pênis de jumentos, de forma geral, são, proporcionalmente maiores, que os de garanhões se comparados ao seu porte (KREUCHAUF, 1984). A ampola do ducto deferente e a cauda do epidídimo são mais desenvolvidas em jumentos que em garanhões, resultando em uma maior capacidade de estocagem espermática em asnos, que, frequentemente, ejaculam em maior concentração, porém com menor volume seminal que garanhões (WILBORN; PUGH, 2011).

De forma geral, as amostras de sêmen tendem à neutralidade de pH, visto que o pH ácido inibe o metabolismo espermático, enquanto o alcalino o estimula (PICKETT et al., 1976). Valores similares de pH têm sido observados, entre asininos e equinos, com média gerando em torno de 7,3 (DORADO et al., 2014). Também são similares os valores de osmolaridade seminal encontrados, para jumentos e equinos, variando, em média, de 290 a 333 mOsm (BALL, 2008; MORAIS; MUCCILO; VIANA, 1994; PICKETT et al., 1975). Entretanto foi observado que a célula espermática de asininos parece ser mais sensível ao meio hiposmótico em relação à de equinos (MIRO et al., 2005).

A morfologia espermática de jumentos é semelhante à dos garanhões, porém tem sido observado menor percentual de defeitos, não ultrapassando os 18% na maioria dos estudos (ARRUDA et al., 1989; CASTEJÓN, 2005; HENRY et al., 1987; LEGHA; PAL, 2012). Nos equídeos, a cabeça dos espermatozoides tem formato assimétrico e a inserção abaxial da cauda é frequente e considerada normal (SAMPER, 2009).

A qualidade seminal parece ser melhor e mais padronizada em jumentos que em garanhões. A motilidade total, no sêmen fresco de jumentos, varia de 70

a 100% (CANISSO et al., 2011; MIRO et al., 2005). Para asnos da raça andaluza (DORADO et al., 2013). A Tabela 1 mostra as características espermáticas de 60 ejaculados coletados de 12 asnos andaluzes e os resultados são comparáveis a outros estudos prévios que relatam parâmetros de outras raças de jumentos (CONTRI et al., 2010, 2012; CORTES-GUTIERREZ et al., 2008; GLORIA et al., 2011; MIRO et al., 2005, 2009).

Tabela 1 - Características espermáticas de 60 ejaculados coletados de 12 asnos andaluzes.

Parâmetro	Valor Médio ± SEM	Intervalo de Confiança (95%)
Volume livre de gel (mL)	67.5±3.8	59.9–75.1
Concentração espermática (x10 <sup>6</sup> /mL)	337.8±18.7	300.1–375.4
Motilidade total (%)	91.7±1.1	89.5–93.9
Motilidade progressiva (%)	75.0±1.8	71.4–78.6
pH	7.3±0.0	7.2–7.3
Total anormalidades morfológicas (%)	16.4±1.1	14.2–18.6
Anormalidades morfológicas cabeça (%)	0.6±0.0	0.4–0.8
Anormalidades do colo, peça intermediária incluindo gota citoplasmática (%)	3.5±0.5	2.4–4.6
Anormalidades da cauda (%)	12.3±1.2	9.9–14.7
VCL (mm/s)	135.5±5.5	124.4–146.5
VSL (mm/s)	90.8±2.6	85.5–96.0
VAP (mm/s)	116.6±4.3	108.1–125.2

Fonte: Adaptada de Dorado et al. (2013).

### 2.3 Membrana plasmática

A membrana plasmática (MP) é a estrutura que define os limites celulares e se apresenta, na forma de um mosaico fluido, composto por duas camadas de fosfolípídeos (FFL) com proteínas integrais e glicoproteínas que são organizados por meio de forças hidrofílicas ou hidrofóbicas ((SINGER; NICOLSON, 1972). A composição da membrana espermática constitui-se de mistura heterogênea de lipídios (fosfolipídios, esteróis e glicolipídios em taxas de, aproximadamente, 70, 25 e 5%, respectivamente) e proteínas ( WATSON, 1995). Essas moléculas se organizam de forma desorganizada e semipermeável e os componentes da membrana são capazes de se movimentar, lateralmente, com certa liberdade (MCINTOSH, 1999; QUINN, 1989). Entretanto a posição dos componentes é alterada à medida que ocorrem quedas na temperatura e a membrana passa do estado fluido ao estado gel ( LADHA, 1998). Essas alterações físicas, na membrana, tornam-na mais rígida, susceptível a rupturas, fusões e permeável a íons ( HAMMERSTEDT; GRAHAM; NOLAN, 1990) ou, no caso da célula espermática, pode acarretar a ativação precoce de fenômenos fisiológicos como a capacitação espermática e a reação acrossomal (FLESCHE; GADELLA, 2000).

Os componentes mais abundantes na bicamada lipídica são os FFL destacando-se a fosfatidilcolina, fosfatidiletanolina e esfingomielina. Entre os esteróis, o colesterol é o mais abundantemente encontrado (QUINN, 1989). Diferenças na composição da membrana espermática entre espécies são fatores importantes na congelabilidade de gametas masculinos. A susceptibilidade dos espermatozoides ao congelamento varia, principalmente, de acordo com a proporção fosfolípídeos:colesterol. O colesterol atua como modulador da fluidez e estabilidade da estrutura da membrana. Espécies que apresentam maior proporção deste, em suas membranas espermáticas, tendem a ser mais resistentes ao congelamento (PARKS; LYNCH, 1992). Espermatozoides de carneiros são



mais sensíveis à criopreservação que os de touros, ainda que esses animais pertençam à mesma subordem de ruminantes e, frequentemente, sejam tratados de forma equivalente em relação à fisiologia reprodutiva (HOLT; NORTH, 1985; WATSON; MARTIN, 1972). Em diferentes estudos, foi observada uma notável superioridade do sêmen asinino em relação à resistência e longevidade, quando preservado a 5°C, em comparação com os equinos (COTTORIELLO et al., 2002; MELLO et al., 2000; ROTA et al., 2004, 2008).

A fluidez da MP depende da temperatura, do conteúdo de colesterol e da composição lipídica, sendo importante o comprimento e grau de insaturação das cadeias de ácidos graxos (MINELLI et al., 1998). Em sêmen de garanhões, a inclusão do colesterol, na membrana espermática, promoveu melhorias significativas nos parâmetros de motilidade e integridade de membrana pós-congelamento. No entanto a fertilidade desse sêmen foi muito prejudicada, fato que foi atribuído ao colesterol incorporado, na membrana plasmática dos espermatozoides, o qual impediu sua capacitação (ZAHN; PAPA; DELL'AQUA JÚNIOR, 2002).

#### **2.4 Princípios da criopreservação**

A exposição das células espermáticas a temperaturas abaixo da fisiológica, mesmo antes de ocorrer a congelação (processo de estabilização das células espermáticas), é responsável por mudanças, na organização bidimensional dos lipídios da membrana espermática e, também, pela alteração das propriedades de enzimas encontradas na membrana, diminuindo a longevidade dos espermatozoides pós-descongelamento, pelas reações precoces semelhantes à capacitação espermática (HOLT, 2000).

Os protocolos de criopreservação expõem as células espermáticas a várias situações de injúrias as quais comprometem sua viabilidade. Variações de temperaturas levam a situações não fisiológicas como estresse osmótico pelos

elevados gradientes de concentração de solutos do meio crioprotetor e à formação e dissolução de cristais de gelo no meio extracelular (WATSON, 2000). A fase de transição se dá por reorganização das cadeias hidrocarbonadas, quando a membrana plasmática passa do estado fluido e desordenado para o estado de gel e tem sua permeabilidade aumentada (DE LEEUW et al., 1990). Tal fase ocorre em função das mudanças na temperatura. Para a célula espermática equina, a fase de transição inicia-se à temperatura de 20,7°C (AMANN; PICKETT, 1987; GRAHAM; FOOTE, 1987). Os danos nesta fase podem ser reduzidos pela adição de lipídeos (gema de ovo), ao meio diluente, lipoproteínas do leite e açúcares (GRAHAM; FOOTE, 1987; KATILA et al., 1997). Entre 19 e 8°C deve-se utilizar curvas de resfriamento lentas (-0,05°C/min) (HEITLAND et al., 1996), pois é neste momento que a célula espermática está mais susceptível ao fenômeno conhecido como “choque pelo frio” (KATILA et al., 1997; MORAN et al., 1992).

Outro efeito importante, durante o resfriamento, é produzido, quando elementos da membrana como proteínas integrais, são agrupados pela separação da fase lipídica (BALL, 1998). Neste processo, as funções dessas proteínas acabam sendo afetadas, como, por exemplo, os canais iônicos de cálcio (ROBERTSON; WATSON, 1986). A regulação do cálcio é, claramente, afetada pelo resfriamento o qual acarreta sérios efeitos sobre a função celular. A saída de cálcio, durante o resfriamento, contribui para mudanças denominadas “reações semelhantes à capacitação” e eventos de fusão entre as membranas plasmática e acrossomal externa, o que seria uma versão desorganizada da reação acrossomal (AGCA; CRITSER, 2002; WATSON, 2000).

No entanto as crioinjúrias mais significantes ocorrem durante os processos de congelamento e descongelamento (HOLT, 2000). Quando as células espermáticas são submetidas a temperaturas de, aproximadamente -5°C, as células e o meio extracelular permanecem não congelados. Entre -5°C e -

10°C, cristais de gelo começam a se formar, no meio extracelular, mas o meio intracelular, ainda, permanece não congelado. Isso indica que a membrana plasmática pode prevenir a propagação do gelo extracelular para o interior da célula até certas temperaturas (GAO; CRITSER, 2000). A formação de gelo, no meio extracelular, faz com que aumente a concentração de solutos, no meio extracelular, elevando a pressão osmótica e causando saída da água do interior das células (MULDREW; MCGANN, 1994; WOLFE; BRYANT, 1999).

Se essas células forem congeladas, rapidamente, não haverá tempo suficiente para desidratarem-se e manterem o equilíbrio osmótico, com possibilidade de formação de cristais de gelo intracelular, o que pode lhes causar danos irreversíveis (GAO; CRITSER, 2000). Por outro lado, se as células forem congeladas, em ritmo mais lento, elas irão se desidratar, por causa do meio extracelular super concentrado, eliminando a possibilidade de formação de grandes cristais de gelo intracelular, entretanto poderão sofrer danos morfofuncionais em decorrência da desidratação celular (MAZUR, 1990).

No descongelamento, as células são expostas aos mesmos fatores, porém de forma inversa: re-hidratação celular pela entrada de água na célula, passando pela membrana plasmática, para balancear a osmolaridade, quando os cristais extracelulares são derretidos. Lipídeos e proteínas da membrana plasmática são reorganizados e o crioprotetor é difundido para fora das células (CHOW; WHITE; PICKETT, 1986).

Espermatozoides submetidos à congelação apresentam grandes cristais de gelo, também, nas mitocôndrias e após a descongelação perdas de conteúdo estrutural. Portanto, como a fosforilação oxidativa e o transporte de prótons são realizados na membrana, é provável que a produção de ATP seja prejudicada neste processo (WATSON, 1995).

Após a espermatogênese, a célula espermática perde a maioria de suas organelas e a capacidade de transcrição de DNA, de forma que a ressíntese de

componentes da membrana torna-se impossível. Como consequência, danos à membrana espermática podem resultar em perda irreversível de motilidade e/ou capacidade fertilizante (AURICH, 2005). Para a fertilização do ovócito, a célula espermática deve possuir atributos como metabolismo, para produção de energia, motilidade progressiva, integridade das membranas (plasmática e acrossomal) e funcionalidade das proteínas relacionadas com os eventos da fertilização (BLANCHARD; VARNER; SCHUMACHER, 2003; HAMMERSTEDT; GRAHAM; NOLAN, 1990). As perdas ocorridas, no processo de criopreservação, são compensadas, em programas de IA com a utilização de doses inseminantes, contendo grande número de espermatozoides (WATSON, 2000).

## **2.5 Estresse osmótico**

Espermatozoides são sensíveis ao estresse osmótico associado à adição e posterior remoção de crioprotetores, assim como às alterações na concentração de solutos, durante o congelamento (WATSON, 2000). Células, ao serem congeladas, são expostas à formação dos cristais de gelo extracelulares, que resultam em concentração hiperosmótica dos solutos (WATSON, 1995). A resposta celular a essa injúria é perder água e retraindo o volume até que a concentração de solutos, entre os compartimentos intra e extracelulares, estejam equilibrados.

Já, quando o sêmen rico em crioprotetores é descongelado e abruptamente transferido, para meio isotônico sem crioprotetor (como diluentes à base de leite desnatado ou secreções do sistema reprodutivo da fêmea), o ambiente intracelular torna-se hiperosmótico, comparado ao extracelular. Pelo fato de a permeabilidade da maioria dos crioprotetores ser muito menor que a da água, há grande influxo dessa, resultando em um aumento de volume celular. Isso é refletido em perda imediata, na motilidade espermática, bem como na

integridade e potencial da membrana mitocondrial (BALL; VO, 2001). A capacidade dos espermatozoides em responder a diferenças de osmolaridade, no meio extracelular e mudanças no volume celular, é essencial para sobrevivência das células à criopreservação e essa regulação volumétrica é associada a fatores como composição de fosfolipídios, permeabilidade à água, temperatura da fase de transição dos lipídios, atividade das bombas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, canais de água e íons (MEYERS, 2005).

Em trabalho, no qual foram utilizados os inibidores oubain e amiloride, para canais  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase da célula espermática de garanhões, demonstrou-se que a regulação osmótica dos espermatozoides foi prejudicada (CAIZA DE LA CUEVA et al., 1997).

Verifica-se que a osmolaridade do fluido seminal equino é de, aproximadamente, 300 mOsm/L (PICKETT; AMANN, 1993). Ball e Vo (2001) observaram redução, na motilidade progressiva e na integridade de membrana, quando expuseram sêmen equino a condições hiperosmóticas com crioprotetores. Porém os maiores danos foram verificados, ao retornar o sêmen, que estava em solução hiperosmótica, para condições de isosmolaridade do sêmen *in natura*. As células espermáticas são mais sensíveis ao ingurgitamento do que à desidratação (MEYERS, 2005).

Pommer, Utlant e Meyers (2002), em estudo no qual objetivou avaliar a tolerância osmótica de espermatozoides de garanhões, na faixa de 75 a 900 mOsm, evidenciaram sensibilidade dos espermatozoides a mudanças bruscas de osmolaridade e observaram que, apesar desses possuírem capacidade de restabelecer seu volume inicial, danos irreversíveis à sua membrana plasmática podem comprometer a capacidade fertilizante.

## 2.6 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo pode ser definido como o desequilíbrio entre substâncias oxidantes e antioxidantes, no qual prevalecem as primeiras, o que leva à liberação de radicais livres, conduzindo ao processo lipoperoxidativo (BETTERIDGE, 2000). As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas pelos próprios espermatozoides ou pelos leucócitos infiltrados no sêmen (GRIVEAU et al., 1995) e são responsáveis por danos espermáticos (CALAMERA et al., 2001; NEILD et al., 2003). As membranas espermáticas de mamíferos são caracterizadas pela presença de altas concentrações de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa, em sua estrutura lipídica, o que as torna, extremamente, susceptíveis ao dano oxidativo, requerendo eficientes sistemas antioxidantes (ALVAREZ; STOREY, 1995; BAUMBER et al., 2003b). A criopreservação e o contato com o oxigênio atmosférico aumentam a geração das EROs, produzindo danos físicos e químicos à membrana espermática, principalmente, na peça intermediária, afetando a motilidade, danificando a cromatina e, conseqüentemente, reduzindo o potencial fertilizante para inseminação artificial (BAUMBER et al., 2003a; DELAMIRANDE; GAGNON, 1992; ZINI; DELAMIRANDE; GAGNON, 1993).

Entretanto os mecanismos oxidativos, também, atuam no controle fisiológico de funções espermáticas (BENNETTS; AITKEN, 2005; KODAMA; KURIBAYASHI; GAGNON, 1996). Pequenas quantidades de EROs são necessárias para que o espermatozoide adquira capacidade fertilizante (SALEH; AGARWAL, 2002). Elas estão, normalmente envolvidas, em funções cinéticas do espermatozoide como a capacitação e o processo de hiperativação (AITKEN; FISHER, 1994; GRIVEAU; LELANNOU, 1997), por meio do estímulo da produção intracelular de cAMP e da fosforilação da tirosina (FORD, 2004). As EROs, também, participam do processo fusogênico do espermatozoide, que o possibilita atravessar a zona pelúcida, realizar a reação acrossomal e se fundir

com a membrana do oócito (GRIVEAU; LELANNOU, 1997). As EROs somente atuam, fisiologicamente, se observadas em baixas concentrações, em excesso elas são, agudamente tóxicas, para as células.

A proteção contra o estresse oxidativo (EO) e a peroxidação lipídica se dá pela condensação da cromatina, minimizando sua exposição ao ataque das EROs e, também, pelos antioxidantes, encontrados no plasma seminal, que mantêm a produção de EROs em níveis fisiológicos (AGARWAL et al., 2014). A maior concentração de antioxidantes celulares está no citoplasma, o qual é, praticamente, todo descartado, durante os estágios finais de diferenciação espermática, levando consigo uma significativa quantia de antioxidantes que protegem contra os efeitos prejudiciais das EROs e da peroxidação lipídica (DEL MAESTRO, 1980). Essa perda substancial de antioxidantes pode ser compensada pela adição de substâncias antioxidantes ao sêmen a ser criopreservado.

Os antioxidantes são substâncias capazes de proteger as células e organismos contra os efeitos deletérios do estresse oxidativo pela neutralização das EROs, tendo a H<sub>2</sub>O como produto final (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

## **2.7 Agentes crioprotetores**

A adição de crioprotetores aos diluentes de congelamento reduz o dano espermático produzido durante o processo de criopreservação (OLDENHOF et al., 2010). A presença de algumas substâncias tais como açúcares, lipoproteína da gema do ovo, proteínas do leite e alguns aminoácidos, no meio diluidor, alteram as suas propriedades físicas e químicas, induzindo a uma maior proteção celular durante o processo de congelamento (KAROW, 2001).

Squires, Keith e Graham (2004) relataram a existência de dois grupos de crioprotetores: não penetrantes e penetrantes. Os primeiros são representados por macromoléculas, com alto peso molecular, tais como açúcares, lipoproteínas da

gema de ovo, proteínas do leite e alguns aminoácidos, eficientes na proteção dos espermatozoides, durante a congelação, contudo sem penetrar nas células. Essas crioprotetores protegem as células por meio de mecanismos osmóticos, promovendo meio hipertônico que induz a saída de água das células, levando à desidratação do espermatozoide e reduzindo a probabilidade de formação de cristais de gelo no interior da célula (AMANN; PICKETT, 1987).

Já os crioprotetores penetrantes são substâncias que atuam tanto no meio intra como extracelular, sendo mais comumente utilizados o glicerol, etilenoglicol, dimetilsulfóxido (DMSO) e amidas (SQUIRES; KEITH; GRAHAM, 2004). Possuem mecanismo de ação, baseado em suas propriedades coligativas ou de ligação com a molécula da água e são essas ligações que mudam a orientação dos cristais de gelo e criam um ambiente menos nocivo para as células espermáticas (DALIMATA; GRAHAM, 1997). Ashwood-Smith (1987) classificou os crioprotetores penetrantes em dois grupos: álcoois (etilenoglicol, propileno-glicol, glicerol) e amidas. Sugeriu que o crioprotetor ideal deve ter baixo peso molecular, boa solubilidade em água e mínima toxicidade aos espermatozoides. Acredita-se que a variação, no volume celular decorrente da entrada e saída do crioprotetor e água (choque osmótico), seja uma das principais causas da baixa viabilidade do sêmen após a descongelação. A utilização de crioprotetores com maior permeabilidade às células espermáticas é desejável, pela possibilidade de minimizar o choque osmótico (GOMES et al., 2002).

Um meio à base de leite, contendo 10% de glicerol, foi usado na obtenção da primeira gestação com sêmen equino criopreservado (BARKER; GANDIER, 1957). Desde então a maioria dos meios crioprotetores, para sêmen de garanhões, consiste em leite, gema de ovo, açúcares, eletrólitos e um agente crioprotetor como o glicerol, etilenoglicol, dimetilsulfóxido (DMSO) ou as amidas (SQUIRES; KEITH; GRAHAM, 2004). Durante os últimos 50 anos, o



glicerol foi considerado o crioprotetor penetrante de referência, para a criopreservação de esperma equino (HOFFMANN et al., 2011), sendo empregado, satisfatoriamente, também, para congelar sêmen de asno (OLIVEIRA et al., 2006; ORTIZ et al., 2015; ROTA et al., 2012; SERRES et al., 2004; TRIMECHE et al., 1996; VIDAMENT et al., 2009). Sem embargo, o glicerol, em razão de sua baixa permeabilidade (BALL; VO, 2001), penetra mais lentamente que a água e outros crioprotetores por entre a membrana espermática equina (GLAZAR et al., 2009), induzindo, assim, ao estresse osmótico, durante os processos de congelamento e descongelamento (PEÑA et al., 2011). O efeito tóxico do glicerol é observado, sobretudo, em concentrações superiores a 3,5% (MACÍAS GARCÍA et al., 2012). Ademais, foi sugerida uma maior sensibilidade ao glicerol em espermatozoide de asno que em espermatozoide de cavalo (VIDAMENT et al., 2009).

### **2.7.1 Etilenoglicol**

O etilenoglicol (EG) é, quimicamente, classificado como álcool, possui quatro pares de elétrons isolados, podendo se ligar a átomos de hidrogênio em quatro sítios e doar dois átomos de hidrogênio (SQUIRES; KEITH; GRAHAM, 2004), podendo, também, realizar ligações de hidrogênio na membrana do espermatozoide (KUNDU et al., 2000).

No congelamento de sêmen de garanhões, o EG tem sido estudado e comparado ao glicerol (ALVARENGA et al., 2000a, 2000b; CHENIER et al., 1998). Em bovinos, os efeitos da adição e subsequente remoção de crioprotetores sobre a motilidade foram estudados por (GUTHRIE; LIU; CRITSER, 2002), visto que a motilidade espermática, após a adição e remoção de 1 M de glicerol, dimetilsulfóxido e etilenoglicol, foi reduzida em 30, 90 e 6%, respectivamente. Esses resultados indicam que, durante a criopreservação do sêmen bovino, o dano celular provocado pela adição e remoção dos

crioprotetores foi menor utilizando-se EG. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos que comparavam etilenoglicol, glicerol e DMSO em equinos (ALVARENGA et al., 2000a). A substituição do glicerol por outros crioprotetores de baixo peso molecular, como o EG e a dimetilformamida, melhorou a qualidade do sêmen congelado de asnos andaluzes, proporcionando maior qualidade espermática em parâmetros seminais pós-descongelamento (ACHA et al., 2015).

## **2.8 Fragmentação do DNA espermático**

Além dos parâmetros tradicionais de avaliação seminal (motilidade, morfologia e integridade de membranas), a análise de fragmentação do DNA espermático (FDE) vem sendo cada vez mais utilizada por ter alta correlação com a fertilidade e baixa correlação com os demais parâmetros frequentemente avaliados (GIWERCMAN et al., 2003). Assim sendo, a exclusão da fragmentação de DNA de uma avaliação seminal pode resultar em uma proporção significativa de fatores de infertilidade não detectados. Também há evidências de que a cromatina danificada, no momento da fertilização, pode ser responsável por uma futura perda embrionária, evento que sempre foi associado à infertilidade feminina (D'OCCHIO; HENGSTBERGER; JOHNSTON, 2007). A análise de fragmentação de DNA é, muitas vezes, fundamental para o diagnóstico de infertilidade em indivíduos com seminograma aparentemente normal (SERGERIE et al., 2005; SHAFIK et al., 2006).

A manipulação espermática de garanhões (resfriamento e congelamento) eleva, significativamente, a deterioração da cromatina espermática (LOPEZ-FERNANDEZ et al., 2007), contribuindo para o declínio da qualidade seminal.

A FDE pode ser avaliada em um único acesso ou de forma dinâmica. A análise da FDE estática é realizada em um tempo inicial, imediatamente após a coleta seminal ou logo após o descongelamento, já a forma dinâmica é realizada,

em diversos acessos, ao longo de um período de incubação, por exemplo, a 37°C (URBANO et al., 2013). Enquanto parâmetros como motilidade e viabilidade espermática declinam, rapidamente, após o descongelamento, o dano à cromatina não é observado nestes primeiros minutos (CORTES-GUTIERREZ et al., 2009). Essas observações sugerem que as injúrias ao DNA espermático ocorrem como consequência indireta dos fatores de estresse associados às mudanças na temperatura e osmolaridade ou instabilidade da membrana plasmática (CORTES-GUTIERREZ et al., 2008). Esses processos patológicos ativam mecanismos apoptóticos como o estresse oxidativo, resultando em DNA fragmentado. Conseqüentemente, é importante que a fragmentação do DNA seja avaliada de forma dinâmica, após os procedimentos realizados, já que estudos em diversas espécies não encontraram diferenças na FDE em um único acesso basal (COSTA et al., 2012; CRESPO et al., 2013; ISACHENKO et al., 2004; ORTIZ et al., 2015; PERIS et al., 2004).

## **2.9 Aminoácidos**

Aminoácidos são moléculas que apresentam sua respectiva carga elétrica que, possivelmente, leva a uma interação eletrostática com os grupos de fosfato da membrana espermática formando uma espécie de superfície protetora contra os efeitos do choque térmico (ANCHORDOGUY et al., 1988).

Alguns organismos como plantas (CHU; ASPINALL; PALEG, 1974; STEWART; LEE, 1974) e mexilhões (LOOMIS; CARPENTER; CROWE, 1988) acumulam aminoácidos em resposta a baixas temperaturas. Por meio de outros estudos, o efeito crioprotetor de alguns aminoácidos foi elucidado, em vários tipos celulares animais, incluindo espermatozoides (HEBER; TYANKOVA; SANTARIUS, 1971; KRUUV; GLOFCHESKI, 1992).

O mecanismo de proteção espermática exercido pelos aminoácidos, ainda, não está completamente esclarecido, uma variedade de hipóteses já foi

proposta por vários autores. Algumas pesquisas em criopreservação seminal compararam o efeito da adição de aminoácidos como cisteína, glicina, glutamina (EL-SHESHTAWY; EL-SISY; EL-NATTAT, 2008), prolina (FARSHAD; HOSSEINI, 2013; LI et al., 2003; SANGEETA et al., 2015) e taurina (CABRITA et al., 2011), em diversas concentrações aos meios crioprotetores e os resultados variam de acordo com o aminoácido, a espécie e a concentração utilizada.

Porém, em altas concentrações, os aminoácidos passam a ter um efeito tóxico sobre o sêmen (AL AHMAD et al., 2008; TRIMECHE et al., 1996), o qual se deve, principalmente, à alta osmolaridade e hipertonicidade quando se eleva demasiado a dose de aminoácidos adicionada ao meio crioprotetor (KHLIFAUI et al., 2005).

A adição dos aminoácidos glutamina, prolina e taurina ao sêmen refrigerado de Asnos Andaluzes contribuiu elevando a sua qualidade em praticamente todos os aspectos avaliados (DORADO et al., 2014). Não foram encontrados, na literatura, estudos que comparam, diretamente, os efeitos dos aminoácidos glutamina, prolina e taurina no sêmen asinino criopreservado.

### **2.9.1 Glutamina**

O alfa aminoácido glutamina em soluções isosmóticas protege células de mamíferos contra os danos provenientes do congelamento/descongelamento (ANCHORDOGUY et al., 1988; KRUUV; GLOFCHESKI; LEPOCK, 1988). A glutamina atua como antioxidante em nível extracelular e seu efeito crioprotetor foi relatado em sêmen equino (KHLIFAUI et al., 2005; TRIMECHE et al., 1999), asinino (TRIMECHE et al., 1996), caprino (KUNDU; DAS; MAJUMDER, 2001), ovino (BUCAK et al., 2009) e humano (RENARD et al., 1996). Ainda que esta proteção não seja tão efetiva como a observada por alguns crioprotetores como o dimetilsulfóxido (DMSO) ou o propilenoglicol (PG), o

mecanismo de proteção da glutamina parece ser independente dos demais crioprotetores, o que permite que a combinação de glutamina com outros crioprotetores possa ser utilizada para reduzir o estresse hipotérmico hipotérmico (KRUUV; GLOFCHESKI, 1990, 1992; KRUUV; GLOFCHESKI; LEPOCK, 1988).

Em carneiros, a adição de glutamina em sêmen criopreservado elevou a atividade da enzima catalase, além da motilidade pós-descongelamento (BUCAK et al., 2008). A enzima catalase está presente em sêmen ovino (UPRETI et al., 1998) e sua função é evitar processos de envelhecimento, controlar o estresse oxidativo celular e, principalmente, impedir a produção excessiva do radical superóxido (BUCAK et al., 2009; UPRETI et al., 1997).

### **2.9.2 Prolina**

Uma variedade de plantas acumulam o aminoácido prolina em resposta a baixas temperaturas (CHU; ASPINALL; PALEG, 1974; STEWART; LEE, 1974). As características desta acumulação induzida pela queda na temperatura é comparada com o acúmulo de prolina que ocorre, também, em casos de estresse hídrico em plantas (CHU; ASPINALL; PALEG, 1974). Withers e King (1979) observaram que a viabilidade das células do milho, após criopreservação, foi superior naquelas suplementadas com prolina. Eles sugerem que a prolina atua como um soluto intracelular não tóxico, protegendo as células contra os efeitos da desnaturação que ocorre na desidratação celular induzida pela hiperosmolaridade em congelamentos lentos. Segundo Anchoroguy et al. (1988), a prolina interage, diretamente, com a membrana fosfolipídica por meio de um mecanismo hidrofóbico, promovendo sua maior estabilidade durante o congelamento (ANCHORDOGUY et al., 1988). Os anéis hidrofóbicos da prolina se associam com as cadeias hidrocarbonadas da membrana fosfolipídica e essa interação é mais estável que outras ligações hidrofóbicas de outras

moléculas. Essa estabilidade crescente aumenta a interação de moléculas como a prolina com a membrana, permitindo que essa ligação permaneça durante todo o processo de congelamento (ANCHORDOGUY et al., 1987).

A adição de prolina ao meio crioprotetor melhorou a qualidade pós-descongelamento em carneiros (SANCHEZ PARTIDA et al., 1992), cães (PEÑA et al., 1998), primatas (LI et al., 2003) e garanhões (TRIMECHE et al., 1996), porém seu efeito em sêmen asinino criopreservados, ainda, não foi elucidado na literatura.

### **2.9.3 Taurina**

Entre os componentes do fluido seminal está a taurina, importante protetora celular contra a acumulação de EROs, em caso de exposição a condições aeróbicas ou em processos de criopreservação (ALVAREZ; STOREY, 1983; HOLMES et al., 1992). É componente natural do sêmen de mamíferos e, mesmo em baixa concentração seminal, a taurina atua como antioxidante natural e sua adição ao sêmen incrementa motilidade e longevidade espermáticas (CHEN; FOOTE; BROCKETT, 1993). A taurina reduziu a inativação da superóxido dismutase (SOD) em espermatozoides de coelhos (ALVAREZ; STOREY, 1983). O superóxido parece ser o maior indutor de peroxidação lipídica em espermatozoides e a SOD catalisa a dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio (ALVAREZ; STOREY, 1989). A taurina que é permeável à membrana plasmática, rapidamente atua, estimulando a ação da SOD e, conseqüentemente, eliminando o superóxido intracelular (ALVAREZ; STOREY, 1983). Desse modo, a taurina reduz o dano espermático pela inibição da taxa de peroxidação lipídica nos espermatozoides.

De uma forma dose-dependente, a taurina, também, decresce a atividade da enzima  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase na membrana espermática (MRSNY; MEIZEL, 1985). A  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase é uma enzima ligada à membrana, que controla os

níveis intracelulares de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , pela troca de  $\text{K}^+$  extracelular por  $\text{Na}^+$  intracelular (ROSSIER; GEERING; KRAEHENBUHL, 1987). A perda de motilidade progressiva que ocorre, quando há altos níveis do tampão fosfato  $\text{K}^+$  no sêmen, é inibida *in vitro* pela taurina (ALVAREZ; STOREY, 1983).

A taurina vem sendo utilizada, para incrementar motilidade e viabilidade em sêmen de várias espécies incluindo coelhos (ALVAREZ; STOREY, 1983), bovinos (SARIÖZKAN et al., 2009), ovinos (Uysal et al., 2005), ratos (Meizel et al., 1980), cães (MARTINS-BESSA; ROCHA; MAYENCO-AGUIRRE, 2007), caprinos (ATESSAHIN et al., 2008) e equinos (IJAZ; DUCHARME, 1995; STEPHENS et al., 2013) com resultados variáveis, de acordo com a espécie animal e a concentração utilizada. A adição de taurina ao meio crioprotetor de peixes foi capaz de fornecer proteção aos espermatozoides, neutralizando as EROs e reduzindo a fragmentação do DNA (CABRITA et al., 2011). Não foram encontrados, na literatura, estudos sobre os efeitos da suplementação de taurina em sêmen criopreservado de jumentos.

### **3 CONSIDERAÇÕES GERAIS**

Os asnos e seus híbridos representam importante parcela dos equídeos no Brasil e no mundo. Apesar da sua semelhança com os equinos, são outra espécie e necessitam ser estudados como tal. Apesar de apresentarem boa qualidade seminal pós-descongelamento, os resultados de fertilidade em jumentas, utilizando-se sêmen criopreservado de jumentas, ainda, são insatisfatórios. Neste sentido, torna-se importante a realização de pesquisas que levem ao aprimoramento da criopreservação seminal nesta espécie.

Estudos comprovaram que a adição de glutamina, prolina e taurina ao meio diluente incrementou a qualidade de sêmen asinino refrigerado e a adição de glutamina incrementou a motilidade espermática em sêmen asinino criopreservado. No entanto são necessários estudos que avaliem, diretamente, a ação dos aminoácidos glutamina, prolina e taurina no sêmen asinino criopreservado, especialmente, naqueles ameaçados de extinção.





## REFERÊNCIAS

ACHA, D. et al. Freezability of Andalusian donkey (*Equus asinus*) spermatozoa: effect of extenders and permeating cryoprotectants. **Reproduction, Fertility and Development**, Clayton, v. 28, n. 12, p. 1990-1998, July 2015.

AGARWAL, A. et al. Effect of oxidative stress on male reproduction. *The world Journal of Men's Health*, v. 32, p. 1-17, 2014.

AGCA, Y.; CRITSER, J. K. Cryopreservation of spermatozoa in assisted reproduction. **Seminars in Reproductive Medicine**, New York, p. 15-24, 2002.

AITKEN, J.; FISHER, H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa - the balance of benefit and risk. **Bioessays**, Cambridge, v. 16, n. 4, p. 259-267, Apr. 1994.

AL AHMAD, M. Z. A. et al. Use of glutamine and low density lipoproteins isolated from egg yolk to improve buck semen freezing. **Reproduction in Domestic Animals**, Hoboken, v.43, n. 4, p. 429-436.

ALVARENGA, M. A. et al. Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket, v. 32, n. 6, p. 541-545, Nov. 2000b.

\_\_\_\_\_. Alternative cryoprotectors for freezing stallion spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 14., 2000, Stockholm. **Proceedings...** Stockholm: [s.n.], 2000a. p. 157.

ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Differential incorporation of fatty-acids into and peroxidative loss of fatty-acids from phospholipids of human spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, Hoboken, v. 42, n. 3, p. 334-346, Nov. 1995.

\_\_\_\_\_. Role of superoxide dismutase in protecting rabbit spermatozoa from O<sub>2</sub> toxicity due to lipid-peroxidation. **Gamete Research**, New York, v. 23, p. 77-90, 1989.

\_\_\_\_\_. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid-peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 29, n. 3, p. 548-555, Oct. 1983.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, New York, v. 7, n. 3, p. 145-173, Oct. 1987.

ANCHORDOGUY, T. et al. Mechanisms of interaction of amino-acids with phospholipid-bilayers during freezing. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 946, n. 2, p. 299-306, Dec. 1988.

\_\_\_\_\_. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. **Cryobiology**, San Diego, v. 24, n. 4, p. 324-331, Aug. 1987.

ARRUDA, R. P. et al. Características Seminais de eqüídeos destinados a seleção para a congelação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 1, p. 214.

ASHWOOD-SMITH, M. J. Mechanisms of cryoprotectant action. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, Cambridge, v. 41, p. 395-406, 1987.

ATESSAHIN, A. et al. Effects of anti-oxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freeze-thawing process. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 77, n. 1, p. 38-44, June 2008.

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 89, n. 1-4, p. 65-75, Oct. 2005.

BALL, B. A. An introduction to the use and implication of cryopreserved equine semen. In: EQUINE ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY WORKSHOP, 1998, Davis. **Proceedings...** Davis: [s.n.], 1998. p. 25-43.

\_\_\_\_\_. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 107, n. 3-4, p. 257-267, Sept. 2008.

BALL, B. A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 22, n. 6, p. 1061-1069, Nov. 2001.

BARKER, C. A. V.; GANDIER, J. C. C. Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. **Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**, Gardenvale, v. 21, n. 2, p. 47-51, Feb. 1957.

BAUMBER, J. et al. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 24, n. 4, p. 621-628, July/Aug. 2003a.

\_\_\_\_\_. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. **Theriogenology**, New York, v. 60, n. 7, p. 1239-1247, Oct. 2003b.

BENNETTS, L. E.; AITKEN, R. J. A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 71, n. 1, p. 77-87, May 2005.

BETTERIDGE, D. J. What is oxidative stress? **Metabolism**, New York, v. 49, n. 2, p. 3-8, Feb. 2000.

BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; SCHUMACHER, J. **Manual of equine reproduction**. Saint Louis: Mosby, 2003. 209 p.

BUCAK, M. N. et al. Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 81, n. 1, p. 13-17, Jan. 2009.

CABRITA, E. et al. The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 125, n. 4, p. 189-195, May 2011.

CAIZA DE LA CUEVA, F. I. C. et al. Resistance to hyperosmotic stress in boar spermatozoa: the role of the ionic pumps and the relationship with cryosurvival. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 48, n. 2-4, p. 301-315, Aug. 1997.

CALAMERA, J. C. et al. Effects of long-term in vitro incubation of human spermatozoa: functional parameters and catalase effect. **Andrologia**, Berlin, v. 33, n. 2, p. 79-86, Mar. 2001.

CANISSO, I. F. et al. Seminal parameters and field fertility of cryopreserved donkey jack semen after insemination of horse mares. **Equine Veterinary Journal**, Hoboken, v. 43, n. 2, p. 179-183, July 2010.

CASTEJÓN, F. C. **Estudio de la congelación del semen e inseminación artificial en el asno zamorano-leonés**. 2005. 140 p. Tese (Facultad de Veterinaria) - Universidad Complutense de Madrid, España, 2005.

CHEN, Y.; FOOTE, R. H.; BROCKETT, C. C. Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood-serum on survival of frozen bull sperm. **Cryobiology**, San Diego, v. 30, n. 4, p. 423-431, Aug. 1993.

CHENIER, T. et al. Evaluation of cryoprotective agents for use in the cryopreservation of equine spermatozoa. **AAEP Proceedings**, Essex, v. 44, p. 5-6, 1998.

CHOW, P. Y. W.; WHITE, I. G.; PICKETT, B. W. Stallion sperm and seminal plasma phospholipids and glycerylphosphorylcholine. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 11, n. 1, p. 207-213, Jan. 1986.

CHU, T. M.; ASPINALL, D.; PALEG, L. G. Stress metabolism. VI.\* Temperature stress and the accumulation of proline in barley and radish. **Functional Plant Biology**, Clayton, v. 1, n. 1, p. 87-97, 1974.

CONTRI, A. et al. Characteristics of donkey spermatozoa along the length of the epididymis. **Theriogenology**, New York, v. 77, n. 1, p. 166-173, Jan. 2012.

\_\_\_\_\_. Efficiency of different extenders on cooled semen collected during long and short day length seasons in Martina Franca donkey. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 120, n. 1-4, p. 136-141, July 2010.

CORTES-GUTIERREZ, E. I. et al. Assessment of sperm DNA fragmentation in stallion (*Equus caballus*) and donkey (*Equus asinus*) using the sperm chromatin dispersion test. **Reproduction in Domestic Animals**, Hoboken, v. 44, n. 5, p. 823-828, Oct. 2009.

\_\_\_\_\_. DNA fragmentation in frozen sperm of *Equus asinus*: Zamorano-Leones, a breed at risk of extinction. **Theriogenology**, New York, v. 69, n. 8, p. 1022-1032, May 2008.

COSTA, A. L. et al. Single layer centrifugation with androcoll-E&lt; sup&gt; TM&lt;/sup&gt; improved progressive motility and percentage of live spermatozoa with intact acrosome of chilled stallion semen but did not have an effect on DNA integrity. **Open Journal of Animal Sciences**, Champaign, v. 2, n.3, p. 159-165, June 2012.

COTTORRELLA, A. C. P. et al. Effect of storage temperature and extenders on "in vitro" activity of donkey spermatozoa. **Theriogenology**, New York, v. 58, n. 3, p. 325-328, Aug. 2002.

CRESPO, F. et al. Colloidal centrifugation of stallion semen results in a reduced rate of sperm DNA fragmentation. **Reproduction in Domestic Animals**, Hoboken, v. 48, n. 2, p. e23-e25, Apr. 2013.

D'OCCHIO, M. J.; HENGSTBERGER, K. J.; JOHNSTON, S. D. Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 101, n. 1, p. 1-17, Sept. 2007.

DALIMATA, A. M.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**, Los Altos, v. 48, n. 5, p. 831-841, Oct. 1997.

DE LEEUW, F. E. et al. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. **Cryobiology**, San Diego, v. 27, n. 2, p. 171-183, Apr. 1990.

DEL MAESTRO, R. F. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta physiologica Scandinavica*. **Supplementum**, Oxford, v. 492, p. 153-168, 1980.

DELMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa .1. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 13, n. 5, p. 368-378, Sept./Oct. 1992.

DORADO, J. et al. Effect of extender and amino acid supplementation on sperm quality of cooled-preserved Andalusian donkey (*Equus asinus*) spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 146, n. 2, p. 79-88, Apr. 2014.

\_\_\_\_\_. Sperm motility patterns in Andalusian donkey (*Equus asinus*) semen: effects of body weight, age, and semen quality. **Theriogenology**, New York, v. 79, n. 8, p. 1100-1109, May 2013.

EL-SHESHTAWY, R. I.; EL-SISY, G. A.; EL-NATTAT, W. S. Use of selected amino acids to improve buffalo bull semen cryopreservation. **Global Veterinaria**, Dubai, v. 2, n. 4, p. 146-150, 2008.

FARSHAD, A.; HOSSEINI, Y. The cryoprotective effects of amino acids supplementation on cooled and post-thaw Markhoz bucks semen quality. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 114, n. 2-3, p. 258-263, Sept. 2013.

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes**, Amsterdam, v. 1469, n. 3, p. 197-235, Nov. 2000.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. **Domestic animal diversity information system hosted (DAD-IS)**. Washington: FAO, 2015. 2p.

FORD, W. C. L. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 10, n. 5, p. 387-399, Sept./Oct. 2004.

GALISTEO, J. et al. Situación actual de la población asnal autóctona española. **Archivos de Zootecnia**, Cordoba, v. 47, n. 178-179, p. 523-528, 1998.

GAO, D.; CRITSER, J. K. Mechanisms of cryoinjury in living cells. **ILAR Journal**, Oxford, v. 41, n. 4, p. 187-196, Oct. 2000.

GIWERCMAN, A. et al. Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters. **Fertility and Sterility**, New York, v. 80, n. 6, p. 1404-1412, Dec. 2003.

GLAZAR, A. I. et al. Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. **Cryobiology**, San Diego, v. 59, n. 2, p. 201-206, Oct. 2009.

GLORIA, A. et al. Differences between epididymal and ejaculated sperm characteristics in donkey. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 128, n. 1, p. 117-122, Oct. 2011.

GOMES, G. M. et al. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed.

**Theriogenology**, Los Altos, v. 58, n. 2-4, p. 277-279, Aug. 2002.

GRAHAM, J. K.; FOOTE, R. H. Effect of several lipids, fatty acyl chain-length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. **Cryobiology**, San Diego, v. 24, n. 1, p. 42-52, Feb. 1987.

GRIVEAU, J. F. et al. Reactive oxygen species, lipid-peroxidation and enzymatic defense systems in human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Bimonthly, v. 103, n. 1, p. 17-26, Jan. 1995.

GRIVEAU, J. F.; LELANNOU, D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. **International Journal of Andrology**, Copenhagen, v. 20, n. 2, p. 61-69, Apr. 1997.

GUTHRIE, H. D.; LIU, J.; CRITSER, J. K. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 67, n. 6, p. 1811-1816, Dec. 2002.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of Mammalian Sperm: What We Ask Them to Survive. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 11, n. 1, p. 73-88, Jan./Feb. 1990.

HEBER, U.; TYANKOVA, L.; SANTARIUS, K. A. Stabilization and inactivation of biological membranes during freezing in the presence of amino acids. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, Amsterdam, v. 241, n. 2, p. 578-592, Aug. 1971.

HEITLAND, A. V. et al. Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Journal**, Hoboken, v. 28, n. 1, p. 47-53, Jan. 1996.

HENRY, M. et al. Características do semen de jumentos da raça nordestina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 7., 1987, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 1987. p. 72.

HOFFMANN, N. et al. Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified 'good' or 'poor' for freezing. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 125, n. 1-4, p. 112-118, May 2011.



HOLMES, R. P. et al. The taurine and hypotaurine content of human semen. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 13, n. 3, p. 289-292, May 1992.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, New York, v. 53, n. 1, p. 47-58, Jan. 2000.

HOLT, W. V.; NORTH, R. D. Determination of lipid composition and thermal phase transition temperature in an enriched plasma membrane fraction from ram spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 73, n. 1, p. 285-294, Jan. 1985.

IJAZ, A.; DUCHARME, R. Effect of various extenders and taurine on survival of stallion sperm cooled to 5 degrees C. **Theriogenology**, New York, v. 44, n. 7, p. 1039-1050, Nov. 1995

ISACHENKO, E. et al. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. **Human Reproduction**, Oxford, v. 19, n. 4, p. 932-939, Apr. 2004

JASKO, D. J. et al. Pregnancy rates utilizing fresh, cooled, and frozen-thawed stallion semen. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS (USA), 1993, [S.I.]. **Proceedings...** [S.I.]: American Association of Equine Practitioners, 1993.

JOHNSON, L. A. et al. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 62, n. 1-3, p. 143-172, Aug. 2000.

KAROW, A. M. Cryobiology 2001 for mammalian embryologists. **Cryobiology**, San Diego, p. 1-37, 2001.

KATILA, T. et al. Comparison of three containers used for the transport of cooled stallion semen. **Theriogenology**, New York, v. 48, n. 7, p. 1085-1092, Nov. 1997.

KHLIFAOU, M. et al. Effects of glutamine on post-thaw motility of stallion spermatozoa: an approach of the mechanism of action at spermatozoa level. **Theriogenology**, New York, v. 63, n. 1, p. 138-149, Jan. 2005.

KODAMA, H.; KURIBAYASHI, Y.; GAGNON, C. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 17, p. 151-157, 1996.

KREUCHAUF, A. Reproductive physiology in the jackass. **Animal Research Development**, Oxford, v. 20, p. 51-78, 1984.

KRUUV, J.; GLOFCHESKI, D. J.; LEPOCK, J. R. Protective effect of l-glutamine against freeze thaw damage in mammalian-cells. **Cryobiology**, San Diego, v. 25, n. 2, p. 121-130, Apr. 1988.

KRUUV, J.; GLOFCHESKI, D. J. Protective effects of amino-acids against freeze thaw damage in mammalian-cells. **Cryobiology**, San Diego, v. 29, n. 2, p. 291-295, Apr. 1992.

\_\_\_\_\_. Survival of mammalian-cells following multiple freeze-thaw cycles ii. Independence of cryoprotection using glutamine with dimethyl-sulfoxide, hydroxyethyl starch, propylene-glycol or glycerol. **Cryo-Letters**, London, v. 11, n. 3, p. 215-226, 1990.

KUNDU, C. N.; DAS, K.; MAJUMDER, G. C. Effect of amino acids on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. **Cryobiology**, San Diego, v. 42, n. 1, p. 21-27, Feb. 2001.

KUNDU, C. N. et al. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemically defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. **Cryobiology**, San Diego, v. 40, n. 2, p. 117-125, Mar. 2000.

LADHA, S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. **The Journal of Membrane Biology**, New York, v. 165, n. 1, p. 1-10, Sept. 1998.

LEGHA, R. A.; PAL, Y. A comparative study of freezing techniques of jack semen. **Veterinary Practitioner**, Bikaner, v. 13, n. 1, p. 88-89, 2012.

LI, Y. H. et al. Effect of amino acids on cryopreservation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) sperm. **American Journal of Primatology**, Hoboken, v. 59, n. 4, p. 159-165, Apr. 2003.

LOOMIS, S. H.; CARPENTER, J. F.; CROWE, J. H. Identification of strombine and taurine as cryoprotectants in the intertidal bivalve *Mytilus edulis*. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, Amsterdam, v. 943, n. 2, p. 113-118, Aug. 1988.

LOPEZ-FERNANDEZ, C. et al. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals - II. The stallion. **Theriogenology**, New York, v. 68, n. 9, p. 1240-1250, Dec. 2007.

MACÍAS GARCÍA, B. et al. Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa: Effects on membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential. **Theriogenology**, Los Altos, v. 77, n. 7, p. 1280-1289, Apr. 2012.

MARTINS-BESSA, A.; ROCHA, A.; MAYENCO-AGUIRRE, A. Incorporation of taurine and hypotaurine did not improve the efficiency of the Uppsala Equex II extender for dog semen freezing. **Theriogenology**, New York, v. 68, n. 8, p. 1088-1096, Nov. 2007.

MAZUR, P. Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. **Cell Biochemistry and Biophysics**, Totowa, v. 17, n. 1, p. 53-92, Aug. 1990.

MCINTOSH, T. J. Structure and physical properties of the lipid membrane. In: DAVLD, W.; DEAMER, A. K.; DOUGLAS, M. F. (Ed.). **Current topics in membranes**. New York: Academic Press, 1999. Chap. 2, p. 23-47.

MEIZEL, S. et al. Taurine and hypotaurine - their effects on motility, capacitation and the acrosome reaction of hamster sperm invitro and their presence in sperm and reproductive-tract fluids of several mammals. **Development Growth & Differentiation**, Hoboken, v. 22, n. 3, p. 483-494, 1980.

MELLO, S. L. V. et al. Effect of split ejaculation and seminal extenders on longevity of donkey semen preserved at 5(circle)C. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 4, p. 372-378, Aug. 2000.

MEYERS, S. A. Spermatozoal response to osmotic stress. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 89, n. 1-4, p. 57-64, Oct. 2005.

MINELLI, A. et al. Occurrence of prostasome-like membrane vesicles in equine seminal plasma. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 114, n. 1, p. 237-243, Nov. 1998.

MIRO, J. et al. Effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure of motile sperm cell subpopulations in refrigerated Catalonian donkey semen. **Theriogenology**, New York, v. 72, n. 8, p. 1017-1022, Nov. 2009.

\_\_\_\_\_. Sperm motility patterns and metabolism in Catalonian donkey semen. **Theriogenology**, v. 63, p. 1706-1716, 2005.

MORAIS, R. N. D.; MUCCIOLO, R. G.; VIANA, W. G. Biologia reprodutiva de jumentos. III. pH, osmolaridade e níveis de eletrólitos no sêmen. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 31, p. 145-151, 1994.

MORAN, D. M. et al. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, New York, v. 38, n. 6, p. 999-1012, Dec. 1992.

MRSNY, R. J.; MEIZEL, S. Inhibition of hamster sperm  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase activity by taurine and hypotaurine. **Life Sciences**, Oxford, v. 36, n. 3, p. 271-275, Jan. 1985.

MULDREW, K.; MCGANN, L. E. The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. **Biophysical Journal**, Cambridge, v. 66, n. 2, p. 532-541, Feb. 1994.

NEILD, D. M. et al. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. **Theriogenology**, Los Altos, v. 59, p. 1693-1705, Apr. 2003.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system1. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, Dec. 2001.

OJASTI, J. **Utilización de la fauna silvestre en América Latina**: situación y perspectivas para un manejo sostenible. Roma: Food & Agriculture, 1993. 248 p.

OLDENHOF, H. et al. Membrane permeability parameters for freezing of stallion sperm as determined by Fourier transform infrared spectroscopy. **Cryobiology**, San Diego, v. 61, n. 1, p. 115-122, Aug. 2010.

OLIVEIRA, J. V. et al. Effect of cryoprotectant on donkey semen freezability and fertility. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 94, n. 1-4, p. 82-84, 2006.

ORTIZ, I. et al. Effect of single-layer centrifugation or washing on frozen-thawed donkey semen quality: Do they have the same effect regardless of the quality of the sample? **Theriogenology**, New York, v. 84, p. 294-300, 2015.

PARKS, J. E.; LYNCH, D. V. Lipid-composition and thermotropic phase-behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, San Diego, v. 29, n. 2, p. 255-266, Apr. 1992.

PEÑA, A. I. et al. Proline and glycine betaine in a diluent for freezing canine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 33, n. 1, p. 5-9, Feb. 1998.

PEÑA, F. J. et al. Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: The way to improve current cryopreservation protocols? **Theriogenology**, Los Altos, v. 76, n. 7, p. 1177-1186, Oct. 2011.

PERIS, S. I. et al. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: Relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 25, n. 2, p. 224-233, Mar. 2004.

PICKETT, B. W.; AMANN, R. P. Cryopreservation of semen. In: MCKINNON, A. O. E.; VOSS, J. L. **Equine reproduction**. Malvern: Lea & Febiger, 1993. p. 769-789.

\_\_\_\_\_. Extension and storage of stallion spermatozoa - a review. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, p. 289-302, 1987.

PICKETT, B. W. et al. Effect of seminal extenders on equine fertility. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 40, n. 6, p. 1136-1143, 1975.

\_\_\_\_\_. Reproductive physiology of the stallion. IV. Seminal and behavioral characteristics1. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 43, n. 3, p. 617-625, 1976.

POMMER, A. C.; RUTLLANT, J.; MEYERS, S. A. The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. **Theriogenology**, New York, v. 58, n. 7, p. 1373-1384, Oct. 2002.

QUINN, P. J. Principles of membrane stability and phase-behavior under extreme conditions. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, New York, v. 21, n. 1, p. 3-19, Feb. 1989.

RENARD, P. et al. Improvement of motility and fertilization potential of postthaw human sperm using glutamine. **Cryobiology**, San Diego, v. 33, n. 3, p. 311-319, June 1996.

ROBERTSON, L.; WATSON, P. F. Calcium transport in diluted or cooled ram semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 77, n. 1, p. 177-185, May 1986.

ROSSIER, B. C.; GEERING, K.; KRAEHENBUHL, J. P. Regulation of the sodium-pump: how and why. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 12, p. 483-487, 1987.

ROTA, A. et al. Donkey jack (*Equus asinus*) semen cryopreservation: studies of seminal parameters, post breeding inflammatory response, and fertility in donkey jennies. **Theriogenology**, Los Altos, v. 78, n. 8, p. 1846-1854, Nov. 2012.

\_\_\_\_\_. Effect of extender, centrifugation and removal of seminal plasma on cooled-preserved Amiata donkey spermatozoa. **Theriogenology**, New York, v. 69, n. 2, p. 176-185, Jan. 2008.

\_\_\_\_\_. Studies on motility and fertility of cooled stallion spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, Hoboken, v. 39, n. 2, p. 103-109, Apr. 2004.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen .2. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 1-36, Mar. 1995.

SALEH, R. A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: From research bench to clinical practice. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 23, n. 6, p. 737-752, Nov./Dec. 2002.

SAMPER, J. C. **Equine breeding management and artificial insemination**. 2. ed. Amsterdam: Elsevier Health Sciences, 2009. 336 p.

SANCHEZ PARTIDA, L. G. et al. Proline and glycine betaine in cryoprotective diluents for ram spermatozoa. **Reproduction Fertility and Development**, East Melbourne, v. 4, n. 1, p. 113-118, 1992.

SANGEETA, S. et al. Role of amino acids as additives on sperm motility, plasma membrane integrity and lipid peroxidation levels at pre-freeze and post-thawed ram semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 161, n. 1, p. 82-88, Oct. 2015.

SARIÖZKAN, S. et al. The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. **Cryobiology**, San Diego, v. 58, n. 2, p. 134-138, Ap. 2009.

SERGERIE, M. et al. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. **Human Reproduction**, Oxford, v. 20, n. 12, p. 3446-3451, Aug. 2005.

SERRES, C. et al. Effect of extender and glycerol concentration on cryopreservation of semen from the Zamorano-Leonés donkey. **Reproduction in Domestic Animals**, Amsterdam, v. 39, p. 267, 2004.

SHAFIK, A. et al. Sperm DNA fragmentation. **Archives of Andrology**, Philadelphia, v. 52, n. 3, p. 197-208, 2006.

SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, Washington, v. 175, n. 4023, p. 720-731, Feb. 1972.

SQUIRES, E. L.; KEITH, S. L.; GRAHAM, J. K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Theriogenology**, New York, v. 62, n. 6, p. 1056-1065, Sept. 2004

STEPHENS, T. D. et al. Effects of pentoxifylline, caffeine, and taurine on post-thaw motility and longevity of equine frozen semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, New York, v. 33, n. 8, 615-621, Aug. 2013.

STEWART, G. R.; LEE, J. A. The role of proline accumulation in halophytes. **Planta**, New York, v. 120, n. 3, p. 279-289, Jan. 1974.

STOREY, B. T. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 3, n. 3, p. 203-213, Mar. 1997

TAMARGO, C. et al. Creación en Asturias de un banco de germoplasma de razas autóctonas. **Archivos de Zootecnia**, Cordoba, v. 58, n. 1, p. 529-532, Dec. 2009.

TRIMECHE, A. et al. Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, Los Altos, v. 52, n. 1, p. 181-191, July 1999.

TRIMECHE, A. et al. Improvement of motility of post-thaw Poitou jackass sperm using glutamine. **Theriogenology**, New York, v. 45, n. 5, p. 1015-1027, Apr. 1996.

UPRETI, G. C. et al. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 48, n. 2-4, p. 269-278, Aug. 1997.

\_\_\_\_\_. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 51, n. 4, p. 275-287, May 1998.

URBANO, M. et al. Effect of cryopreservation and single layer centrifugation on canine sperm DNA fragmentation assessed by the sperm chromatin dispersion test. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 143, n. 4, p. 118-125, Dec. 2013.

UYSAL, O. et al. Evaluation of ram sperm frozen with various taurine concentrations. **Indian Veterinary Journal**, Chennai, v. 82, n. 10, p. 1059-1061, 2005.

VIDAMENT, M. et al. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 112, n. 1-2, p. 22-35, 2009.

\_\_\_\_\_. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 112, n. 1-2, p. 22-35, May 2009.

WALTRAUD, K.; GRUNENFELDER, H.; BROXHAM, E. Donkey Breeds in Europe: inventory, description, need for action, conservation. **Report 2007/2008**, Saint Gallen, p. 62, 2008.



WATSON, P. F.; MARTIN, I. C. A. A comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 28, n. 1, p. 99-101, Sept. 1972.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility and Development**, Clayton, v. 7, n. 4, p. 871-891, 1995.

\_\_\_\_\_. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60-61, n. 1, p. 481-492, July 2000.

WILBORN, R. R.; PUGH, D. G. Donkey reproduction. In: MCKINNON, A. O. et al. **Equine reproduction**. 2. ed. ed. New York: Wiley-Blackwell, 2011. p. 2835-2838.

WITHERS, L. A.; KING, P. J. Proline: a novel cryoprotectant for the freeze preservation of cultured-cells of zea-mays-L. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 64, n. 5, p. 675-678, Nov. 1979.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. **Cryobiology**, San Diego, v. 39, n.2, p. 103-129, Sept. 1999.

ZAHN, F. S.; PAPA, F. O.; DELL'AQUA JÚNIOR, J. A. Cholesterol incorporation on equine sperm membrane: effects on post-thaw sperm parameters and fertility. **Theriogenology**, New York, v. 58, n. 3, p. 237-240, Aug. 2002.

ZINI, A.; DELAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients - levels of superoxide dismutase-like and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. **International Journal of Andrology**, Hoboken, v. 16, n. 3, p. 183-188, June 1993.

**SEGUNDA PARTE - ARTIGO****ARTIGO 1 - USE OF TWO ALPHA AMINO ACIDS (GLUTAMINE AND PROLINE) AND 2-AMINOETHANESULFONIC ACID (TAURINE) TO IMPROVE DONKEY SEMEN CRYOPRESERVATION**

M. Bottrel<sup>ad</sup>, D. Acha<sup>a</sup>, M. Hidalgo<sup>a</sup>, I. Ortiz<sup>a</sup>, M.J. Gálvez<sup>a</sup>, J.J. Carrasco<sup>b</sup>, V. Gómez-Arrones<sup>b</sup>, J. Gósalvez<sup>c</sup>, J. Camisão<sup>d</sup>, J. Dorado<sup>a,\*</sup>

**Artigo formatado segundo as normas do periódico ao qual foi submetido:**

Animal Production Science

**Correspondence:**

<sup>a</sup>Veterinary Reproduction Group, Department of Animal Medicine and Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, University of Cordoba, 14071 Córdoba, Spain

<sup>b</sup>Equine Reproduction Center, Centro de Selección y Reproducción Animal, (CENSYRA-Extremadura Government), 06007 Badajoz, Spain

<sup>c</sup>Department of Biology, Genetics Unit, Autonomous University of Madrid, 20849 Madrid, Spain

<sup>d</sup>Zootecnia Department, Federal University of Lavras (UFLA), 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brazil

\*Corresponding author at: Department of Animal Medicine and Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, University of Cordoba, Campus de Rabanales (Edif. Hospital Clínico Veterinario), Ctra. Madrid-Cádiz, km 396, 14071 Córdoba, Spain. Tel: +0034 957 212136; Fax: +0034 957 211093. E-mail address: [jdorado@uco.es](mailto:jdorado@uco.es) (J. Dorado).

### ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the effect of amino acid addition on post-thaw quality of donkey semen. Eighteen ejaculates were pooled, split, and cryopreserved in Gent A<sup>®</sup> containing 1% ethylene glycol (Gent-EG) supplemented with 0 (as control), 20, 40, or 60 mM for each glutamine, proline, or taurine. The high concentration (60 mM) of glutamine and taurine resulted in a better ( $P<0.001$ ) post-thaw motility results. Amino acid supplementation did not improve ( $P>0.05$ ) sperm morphology and membrane plasma integrity compared with the control samples. While improvement ( $P<0.05$ ) was observed at 60 mM for acrosome integrity when using glutamine. After thawing, no differences ( $P>0.05$ ) were found for sperm DNA fragmentation index (sDFI) between treatments. However, 60 mM glutamine and 40 mM taurine reduced ( $P<0.05$ ) sDFI values in the first 6 h of incubation, compared to the control samples. At 24 h, the sDFI values were lower ( $P<0.05$ ) in supplemented samples than in control ones, except 20 mM proline. In conclusion, the supplementation of the Gent-EG extender with glutamine or taurine at 60 mM improved post-thaw donkey sperm quality. However, the addition of proline to the freezing extender did not provide any significant improvements in sperm quality, compared to the control group.

**Additional Keywords:** amino acids, Andalusian donkey, frozen-thawed semen, sperm quality.

## INTRODUCTION

Spanish donkey breeds (Andalusian, Asno de las Encartaciones, Balear, Catalanian, Majorera, and Zamorano-Leonés) are at a serious risk of extinction (Real Decreto 2129/2008, regulation of the National Catalogue of Endangered Species). All of them have suffered a rapid and substantial decrease in their population size and consequently in their genetic variability (Aranguren-Mendez et al., 2001). At the present time, the Andalusian donkey (*Equus asinus*) is located mainly in Andalusia and Extremadura (southwestern Spain), and its population does not exceed 793 animals (<http://dad.fao.org/>, D.A.D.I.S., Accessed July 2, 2014). In such situation, the improvement of semen cryopreservation protocols in endangered donkey breeds would allow a more efficient use of cryopreserved donkey semen for insemination and the establishment of sperm banks.

Cryopreservation induces irreversible damage to equine spermatozoa mainly due to an osmotic imbalance at thawing (Morris et al., 2007), resulting in a significant loss of viable spermatozoa after thawing. At the same time, a variable percentage of the surviving population experiences sublethal damage resulting in a reduced lifespan (Watson, 2000). Another source of osmotic stress is the permeating cryoprotectant used (Glazar et al., 2009), causing the cells to shrink or swell during the processes of cryoprotectant addition or removal respectively. In recent years, studies have been conducted on donkey semen extenders, including cryoprotectants such as glycerol, ethylene glycol, dimethyl sulfoxide, dimethyl acetamide, and dimethyl formamide,

in order to improve post-thaw quality of spermatozoa (Trimeche et al., 1998; Oliveira et al., 2006; Vidament et al., 2009; Rota et al., 2012; Acha et al., 2015c). However, artificial insemination (AI) with cryopreserved donkey semen has given disappointing results (Rota et al., 2012). The addition of other cryoprotectants (e.g., amino acids) to the freezing media not only could improve post-thaw semen quality but also fertility of donkey spermatozoa. To date, the incorporation of taurine in the freezing extender has improved post-thaw sperm motility in bulls (Chen et al., 1993) and rams (Bucak et al., 2007). Conversely, in dogs, Matins-Bessa *et al.* (2007) concluded that supplementation of the Uppsala extender with taurine (25-75 mM) does not improve sperm post-thaw mitochondrial activity or semen motility and viability. The addition of proline at 30-50 mM in modified INRA82 extender significantly enhanced post-thaw motility of stallion semen (Trimeche et al., 1999), and the inclusion of glutamine (30-80 mM) in the freezing extender has resulted in better motility and velocity in stallion (Trimeche et al., 1999; Khelifaoui et al., 2005) and donkey (Trimeche et al., 1996) frozen-thawed spermatozoa. However, Phetudomsinsuk *et al.* (2009) reported that the inclusion of glutamine (50 mM) in freezing extenders resulted in a significant decrease in sperm motility and plasma membrane integrity of frozen-thawed stallion spermatozoa. The disparity of results obtained by these previous studies suggests a species-specific effect depending not only on the type of amino acids but also on the concentration used, which has been suggested by Cabrita *et al.* (2011). No reports have been published on Andalusian donkey semen preservation using amino acids as cryoprotectants.

In a previous study (Acha et al., 2015c), we found that the extender Gent<sup>®</sup> A (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany) supplemented with 1% (v:v) ethylene glycol (Gent-EG) improved the outcome of cryopreservation of Andalusian donkey spermatozoa. The aim of the present study was to compare the effect of Gent-EG supplementing with different concentrations (0, 20, 40, and 60 mM) of glutamine, proline, and taurine on post-thaw quality of Andalusian donkey semen. Sperm quality was assessed by their motility, morphology, plasma membrane integrity, sperm DNA fragmentation, and acrosome integrity.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Experimental animals*

This study was conducted at the Veterinary Teaching Hospital of the University of Cordoba (Spain). Eighteen ejaculates were collected from six healthy, mature Andalusian donkeys (6 to 15 years of age) of proven fertility. The jackasses were housed in individual paddocks and were fed daily with hay and grain, and water was freely available.

Semen was collected from the jackasses using a Missouri-model artificial vagina (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany) with an in-line gel filter (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany). A jenny in natural or prostaglandin-induced estrus (Luprostiol, 7.5 mg intramuscularly; Prosolvin, Intervet International B.V., Boxmeer, The Netherlands) was used to induce copulatory activity.

### *Semen evaluation*

Immediately after collection the gel-free fraction of each ejaculate was evaluated to determine the volume, sperm concentration, and seminal pH. At the same time, an aliquot of the ejaculate was diluted in pre-warmed (37 °C) skim milk-glucose extender (EquiPro<sup>®</sup> A, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany) without antibiotics to a final concentration of  $25 \times 10^6$  spermatozoa/mL (Dorado et al., 2014). Aliquots of the diluted semen were subsequently taken as needed to conduct the appropriate analyses.

Sperm motility was assessed using the computer-assisted sperm analyzer (CASA) system Sperm Class Analyzer (Microptic SL, Barcelona, Spain), as described by Miro et al. (2005) for donkey semen. Prior to the assessment of movement, aliquots of diluted semen were incubated at 37 °C for 5 (fresh semen) or 10 min (frozen-thawed samples). For each evaluation, three consecutive 5 µL drops of each diluted semen sample were evaluated using a phase contrast microscope (Eclipse 50i, Nikon, Tokyo, Japan) with a pre-warmed stage at 37 °C at 100 X magnification. Two microscopic fields per drop were filmed randomly, including a minimum of 200 spermatozoa. Objects incorrectly identified as spermatozoa were minimized by using the playback function. Regarding the setting variables of the program, spermatozoa with a mean average path velocity (VAP) < 10 µm/s were considered immotile. Spermatozoa with VAP > 90 µm/s were considered as rapid, while spermatozoa deviating < 25% from a straight line were designated as linear motile. The measured variables of sperm motion were total motility (MOT; %), progressive motility (PMOT; %), curvilinear velocity

(VCL;  $\mu\text{m/s}$ ), straight line velocity (VSL;  $\mu\text{m/s}$ ); average path velocity (VAP;  $\mu\text{m/s}$ ), linearity (LIN, as  $\text{VSL/VCL}$ ; %), straightness (STR, as  $\text{VSL/VAP}$ ; %), wobble (WOB, as  $\text{VAP/VCL}$ ; %), beat cross frequency (BCF; Hz), and amplitude of lateral head displacement (ALH;  $\mu\text{m}$ ). Definitions of these descriptors of sperm movement can be found in Dorado *et al.* (2007).

Sperm morphology was examined by light microscopy evaluation (Olympus BH-2, Olympus Optical Co., LTD, Tokyo, Japan) on smears stained with Diff-Quick<sup>®</sup> (Medion Diagnostics AG, Düringen, Switzerland) staining (Brito, 2007). At least 200 spermatozoa per slide were counted to determine the percentage of spermatozoa with abnormal morphology (ASM, %).

Sperm membrane integrity was assessed using the double stain propidium iodide (PI) with acridine orange (AO) from the Vital-Test<sup>®</sup> kit (Halotech SL, Madrid, Spain), as described by (Dorado *et al.*, 2014). At least 200 spermatozoa per slide were counted with fluorescence microscopy (Olympus BX40, Tokyo, Japan), using a U-ND25-2 filter (a 460-490 nm excitation filter). The results are expressed as percentages of membrane-intact spermatozoa – MIS (AO+; %).

To evaluate the sperm acrosomes, the PI/peanut agglutinin-fluorescein isothiocyanate (FITC-PNA) double stain (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany), was used as described by (Dorado *et al.*, 2014). Values were expressed as percentages of acrosome-intact spermatozoa – AIS (PI+/FITC-PNA+; %) and acrosome-reacted spermatozoa – ARS (PI+/FITC-PNA-; %).



Sperm DNA fragmentation (SDF) was assessed post-thaw using the Halomax<sup>®</sup> Kit (Halotech DNA SL, Madrid, Spain) as described Ortiz *et al.* (2015a) for donkeys. A dynamic approach to the determination of SDF was also conducted by incubating aliquots of the original diluted sample at 37 °C over 24 h. Consequently, SDF was assessed at T0 (baseline), T6 and T24 h (Crespo *et al.*, 2013a). For each sample, a minimum of 300 spermatozoa were counted using a fluorescence microscope at 400X magnification. The percentage of spermatozoa with fragmented DNA (large halos of chromatin dispersion, at least the double diameter than the core) was calculated and expressed as a percentage of the total sperm count (sDFI, %).

#### *Freezing extenders*

The reference cryopreservation extender (Gent-EG, as control) used in this study was composed of Gent<sup>®</sup> A supplemented with 1% (v:v) ethylene glycol (ETO 190, Scharlan Chemie S.A., Barcelona, Spain) (Acha *et al.*, 2015c). The amino acids glutamine, proline, and taurine were added to the control extender at the following concentrations: 0, 20, 40, and 60 mM respectively. All extenders were prepared before the first semen collection and kept frozen at -18 °C in 10 mL aliquots until use. Osmolality and pH of the cryopreservative extenders were measured using a freezing-point digital micro-osmometer Type 6 (Löser Messtechnik, Berlin, Germany) and a pH meter (HI 2211-02, Hanna Instruments Inc., Woonsocket, RI, USA) respectively, and are reported in Table 1.

### *Semen freezing and thawing*

Semen quality was assessed before freezing as detailed below. The cryopreservation protocol was based on that of Serres (2003), with some modifications. Briefly, aliquots (3 mL) of each ejaculate were pooled (two ejaculates per pool) and diluted 1:1 (v:v, semen:extender) with EquiPro<sup>®</sup> A. Pooled semen samples were centrifuged at 400 X g for 7 min at 20 °C to remove seminal plasma and the pellet re-suspended at a final concentration of 200 x10<sup>6</sup> spermatozoa/mL in 10 different extenders (Table 1). For semen cooling from 20 °C to 5 °C, all tubes containing the different media were placed in an Equitainer<sup>™</sup> I (Hamilton Research, Inc., Danvers, MA, USA) for 120 min. Each cooled sample was packaged in 0.5 mL plastic straws (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany) and frozen in liquid nitrogen (LN<sub>2</sub>) vapour 2.5 cm above the surface for 5 min, after which time they were plunged directly into LN<sub>2</sub>. After 1 month of storage, straws were thawed individually at 37 °C for 30 s in a water bath for evaluation.

Semen assessments were performed after recovery (in skim milk-glucose extender) and after thawing in the tested extenders. For assessment, aliquots of diluted semen were incubated to 37 °C and evaluated as described previously.

### *Experimental design*

To evaluate the effect of amino acid addition on post-thaw quality of donkey semen, three ejaculates were collected from six donkeys (total of 18). Ejaculates from two donkeys were pooled on each collection day to avoid uncontrolled male-to-male variation (Dorado et al., 2014). Nine

pooled semen samples (two ejaculates per pool; three replicates) were divided into ten aliquots and cryopreserved in Gent-EG supplemented with 0 (as control), 20, 40, or 60 mM for each glutamine, proline, or taurine. Semen quality was evaluated before and after the freeze-thawing process.

#### *Statistical analysis*

Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. All data were analyzed using the SAS statistical package (v9.0; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Normality of data was assessed with the Kolmogorov-Smirnov test. Since data reported in this study were not normally distributed, percentages were subjected to arc sine transformation and absolute measures to logarithmic transformation.

Semen characteristics of frozen-thawed semen were analyzed with a univariate approach using a repeated measure GLM. Extender treatment was considered to be fixed factor, whereas different pools of semen were considered to be random. Differences between mean values were analyzed by the Duncan method.

In order to analyze the effect of incubation time on SDF a regression analysis, including a comparison of individual regression equations, was conducted separately for each treatment. In addition, the slopes ( $b$  coefficients) and  $Y$ -axis intercepts ( $a$  coefficients) of the regression equations of each treatment were compared. A significant difference in the slope of the regression equations was indicative of a difference in the rate of increase of DNA fragmentation between treatments, whereas a significant difference in the intercepts was

representative of an overall difference in level of fragmentation between treatments.

## RESULTS

Ejaculates used in this study ( $n = 18$ ) had the following characteristics: a gel-free volume of  $73.69 \pm 6.74$  mL (range: 30 to 125 mL), sperm concentration of  $367.78 \pm 28.34 \times 10^6$  spermatozoa/mL (range: 179 to  $560 \times 10^6$  spermatozoa/mL), and pH of  $7.36 \pm 0.05$  (range: 6.9 to 7.7).

Data for comparisons of semen quality analysis are provided in Table 2. The high concentration (60 mM) of the amino acids glutamine and taurine resulted in a better ( $P < 0.001$ ) post-thaw motility parameters (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, and WOB) compared to those of control samples (Gent-EG without amino acid supplementation). In addition, taurine at 60 mM has significant ( $P < 0.001$ ) improvement in ALH and BCF. Motility *results* (MOT and PMOT) of those samples supplemented with glutamine and taurine at 60 mM were comparable to those of control samples (Table 2). However, the addition of either proline at any concentration (20, 40, and 60 mM) or glutamine and taurine at low concentrations (20 and 40 mM) results in reduced ( $P < 0.001$ ) post-thaw motility (MOT and PMOT) in comparison with control samples. There were no significant ( $P > 0.05$ ) differences for the CASA-derived motility variables between glutamine, proline, and taurine at any concentration (20, 40, and 60 mM), except for MOT and PMOT (Table 2).

The additives glutamine, proline, and taurine did not improve the mean ASM values (Table 2), compared to use of Gent-EG without amino acid supplementation. However, no differences ( $P>0.05$ ) were observed between glutamine at 40 and 60 mM, taurine at 60 mM and control samples. Improvement ( $P<0.05$ ) was observed at 60 mM for AIS when using glutamine; however, there was no improvement ( $P>0.05$ ) when glutamine, proline, or taurine were used at 20 mM (Table 2). No significant ( $P>0.05$ ) differences were found in mean MIS values between glutamine at 60 mM and control samples.

Cryopreservation of donkey spermatozoa reduced significantly ( $P<0.01$ ) post-thaw quality regardless of the extender used, with the exception of *LIN*, *STR*, *WOB*, *BCF*, and *ASM* (Table 2). An effect ( $P<0.01$ ) of different semen pool on the quality of the frozen-thawed semen was recorded for *MOT*, *VCL*, *VSL*, *VAP*, *WOB*, and *AIS*.

Data for comparisons of the sperm DNA fragmentation index (sDFI) at different incubation times (0, 6, and 24 h) are shown in Table 3. Sperm DNA fragmentation commenced immediately on thawing and increased significantly ( $P<0.001$ ) over incubation time in all ten treatments. After thawing (T0), no significant ( $P>0.05$ ) differences were found for sDFI between treatments. However, a significant ( $P<0.05$ ) effect of treatment was found from T6 to T24. At 6 h of incubation, the addition of amino acids to the Gent-EG extender tended to improve the sDFI results, with significant ( $P<0.05$ ) differences seen between glutamine at 60 mM and taurine at 40 mM and control samples. At 24 h, the sDFI values were lower ( $P<0.05$ ) in Gent-EG supplemented at

different concentrations of amino acids than in Gent-EG with no supplementation (control extender), except proline at 20 mM.

Regression analysis of the sDFI showed no difference ( $P>0.05$ ) with respect to the slopes of the regression equations, indicating that sDFI increased over time at the same rate in all treatments (Table 3). There was, however, a significant ( $P<0.05$ ) difference in the intercepts of the regression equations, indicating that sDFI was different between treatments. Using control extender, fragmentation level was higher when compared to the other extenders, with the exception of proline at 20 mM.

## **DISCUSSION**

Cryopreservation is associated with the production of reactive oxygen species (ROS) that results in lipid peroxidation (LPO) of sperm membranes, which reduces motility, viability and fertilizing ability of spermatozoa (Aitken and Fisher, 1994; Bucak et al., 2007). Previous studies have demonstrated that the addition of amino acids to the freezing extender positively improves the sperm quality after freezing-thawing. Therefore, the amino acids glutamine and proline have been successfully used to protect stallion (Trimeche et al., 1999; Khlifiaoui et al., 2005) and donkey (Trimeche et al., 1996) spermatozoa against freeze-thaw damage. Similarly, the addition of these two and other amino acids (e.g., taurine, hypotaurine, and cysteine) to freezing extender improved post-thaw sperm quality in humans (Renard et al., 1996), bulls (Chen et al., 1993), bucks (Al Ahmad et al., 2008; Atessahin et al., 2008; Farshad and Hosseini, 2013a), rams (Sanchez Partida et al., 1992; Sanchez-Partida et

al., 1997; 1998; Bucak and Tekin, 2007), and dogs (Peña et al., 1998; Martins-Bessa et al., 2007; Bencharif et al., 2012). However, to date, no direct comparisons between the amino acids glutamine, proline, and taurine for donkey semen cryopreservation were found in the literature.

In general, the results of the present study demonstrated that the addition to the extender Gent-EG of glutamine or taurine at 60 mM significantly improved the post-thaw quality of Andalusian donkey semen in terms of sperm motility parameters, acrosome integrity, and DNA integrity without affecting values of sperm morphology and plasma membrane integrity. Our findings are consistent with some previous studies, suggesting a protective effect of these amino acids on donkey spermatozoa during cryopreservation. In horses, the addition of glutamine to the extender INRA82 had a positive influence on post-thaw sperm motility characteristics for concentrations above 50 mM (Trimeche et al., 1999). More recently, Khlifiaoui *et al.* (2005) reported that the addition of 50 mM glutamine in the modified INRA82 extender significantly improved post-thaw motility, whereas a drop in motility after thawing was observed at concentrations of 75, 100, and 150 mM. Similarly, in donkeys, post-thaw motility was significantly higher in 80 mM glutamine than in 120 or 240 mM glutamine (Trimeche et al., 1996). In our experiment, concentrations higher than 60 mM were, however, not tested and subsequently their effect (positive or negative) on post-thaw motility could not be determined. Because the toxic effect of amino acids has been related to an increase in osmotic pressure rather than their use at higher concentrations (Li et al., 2003; Khlifiaoui et al., 2005), we could observed

that, until the osmotic pressure of 597 mOsm/kg, the beneficial effects of the amino acids supplementation were still increasing.

In line with a previous research (Stephens et al., 2013), CASA analysis also revealed a significant enhancement of sperm velocity (VCL, VSL, and VAP) when 60 mM glutamine or taurine were added to freezing media, which is particularly interesting because the sperm velocities ascertained by CASA assessments have been previously correlated with *in vivo* fertility in Andalusian donkeys (Dorado et al., 2013b). However, we have observed that the protective effect exerted by these two amino acids at 60 mM in frozen semen was in general lower than those observed in cooled semen (Dorado et al., 2014). Similar findings have been reported in horses, in which the addition of taurine to the semen extender improved the quality of fresh and cooled semen (Ijaz and Ducharme, 1995), but failed to improve the quality of cryopreserved sperm (Stephens et al., 2013). Perhaps the beneficial effects on donkey semen post-thaw motility of these amino acids could be shown at higher concentrations.

In a recent study, Phetudomsinsuk *et al.* (2009) reported that supplementing glutamine (50 mM) into the extender INRA-egg yolk did not produce any beneficial effect on plasma membrane integrity of frozen-thawed stallion spermatozoa. Similarly, in our study, plasma membrane integrity in extenders supplemented with these three amino acids was lower than that without amino acid supplementation, except glutamine at 60 mM. These contrasting findings can be explained by differences in the extenders and freezing-thawing procedures used. Similar findings were observed for acrosome integrity; however, no



references have been found concerning the effects of both glutamine and taurine on sperm morphology and acrosome integrity of cryopreserved equine spermatozoa.

Interestingly, the incorporation of proline did not result in significant improvements of post-thaw motility, sperm morphology, acrosome integrity, membrane integrity or DNA integrity, which is in contrast to previous findings for rams (Sanchez Partida et al., 1992; Sanchez-Partida et al., 1998), dogs (Peña et al., 1998), and stallions (Trimeche et al., 1999). The reason for the absence of a positive effect of proline on post-thaw donkey sperm quality is not documented in any detail, and can only be speculated upon. Therefore, it is plausible to consider a species-specific effect of the amino acids on the quality of frozen-thawed semen, as has been previously suggested (Cabrita et al., 2011; Dorado et al., 2014). Another hypothesis is that perhaps its protective action in donkey spermatozoa is not evident at the concentrations used in the present study.

Sperm DNA fragmentation has emerged as a potential biomarker of sperm quality, able to identify male infertility, due to its strong correlation with fertility (Morrell et al., 2008; Love, 2011). Immediately after thawing (T0), no differences in the sDFI were found between control samples and the supplemented ones. In our experiment, the dynamics of sperm DNA fragmentation showed that 60 mM glutamine and 40 mM taurine significantly reduced the sDFI values in the first 6 h of incubation, compared to control group. At 24 h, the addition of the three amino acids at any concentration tested significantly reduced the sDFI values compared to control group, but 20 mM proline. Our results are consistent

with previous studies conducted on horses (Crespo et al., 2013a) and donkeys (Cortes-Gutierrez et al., 2008; Ortiz et al., 2015a), where no differences in DNA fragmentation baseline values were found after the freezing–thawing process. These studies support that DNA fragmentation should be assessed as a dynamic parameter to evaluate the stability of DNA molecule after submitting semen samples to different stressors. In our study, the sDFI regression lines were parallel (no significant differences between slopes) and the intercepts were significantly lower for most of amino acid-supplemented samples (except 20 mM proline), therefore, sDFI values were higher in control and 20 mM proline than in the remaining treatments. In this context, the lower DNA damage level obtained when supplementing the extender with amino acids could be associated with greater sperm viability in the female genital tract (Cortes-Gutierrez et al., 2008).

It has been suggested that DNA damage following cryopreservation is a consequence of the stressors associated with changes in temperature, osmolality and plasma membrane instability, with a subsequent increase in oxidative stress that results in fragmented DNA (Lopez-Fernandez et al., 2007). The precise mechanism by which the amino acids protect spermatozoa during cryopreservation is unknown; however, it seems to be due to their free radical-scavenging property (Griveau et al., 1995; Ijaz and Ducharme, 1995), which inhibits the loss of forward motility and protects the sperm membrane, acrosome and DNA integrity against LPO (Alvarez and Storey, 1983). Moreover, sulfonic amino acids (e.g. taurine, hypotaurine, etc.) reduce the ROS accumulation in extenders during cryopreservation (Alvarez and Storey,

1989; Holmes et al., 1992; Bucak et al., 2007). Furthermore, Meizel *et al.* (1980) reported that taurine could be of further advantage to spermatozoa integrity due to its osmoregulatory and capacitating properties. More recently, Trimeche *et al.* (1996) reported that glutamine has an active role in recovery of sperm metabolism by acting at the extracellular level. Previous studies indicate that some amino acids protect spermatozoa from temperature-related damage by specific interactions with cell membrane phospholipid bilayers during freezing (Anchordoguy et al., 1988a; Storey and Storey, 1990).

In conclusions, this study demonstrated that the supplementation of the freezing extender (Gent-EG) with glutamine or taurine at concentrations of 60 mM improved post-thaw donkey sperm quality in terms of sperm motility parameters, acrosome integrity, and DNA integrity, compared to the control samples. This would allow a more efficient use of cryopreserved donkey semen for insemination and the establishment of sperm banks. However, the addition of proline to the freezing extender did not provide any significant improvements in sperm quality, compared to the control group. Further experiments must be conducted to elucidate the exact concentration of amino acids that should be added to the extender for an ideal donkey sperm protection during freeze-thawing process.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors are extremely indebted to Fundación Casa del Burro (Rute, Cordoba, Spain) for providing some of the animals. This study was

supported by grant RZ2009-00006-00-00 (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain).

### **Competing interest**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### **REFERENCES**

- Acha, D., Hidalgo, M., Ortiz, I., Gálvez, M.J., Carrasco, J.J., Gómez-Arrones, V., Dorado, J., 2015a. Freezability of Andalusian donkey (*Equus asinus*) spermatozoa: effect of extenders and permeating cryoprotectants. *Reproduction, Fertility and Development*, -.
- Acha, D., Hidalgo, M., Ortiz, I., Gálvez, M.J., Carrasco, J.J., Gómez-Arrones, V., Dorado, J., 2015b. Freezability of Andalusian donkey (*Equus asinus*) spermatozoa: effect of extenders and permeating cryoprotectants. *Reproduction, Fertility and Development*, -.
- Acha, D., Hidalgo, M., Ortiz, I., Gálvez, M.J., Carrasco, J.J., Gómez-Arrones, V., Dorado, J., 2015c. Freezability of Andalusian donkey (*Equus asinus*) spermatozoa: effect of extenders and permeating cryoprotectants. *Reproduction, Fertility and Development*, in press.
- Agarwal, A., Virk, G., Ong, C., du Plessis, S.S., 2014. Effect of oxidative stress on male reproduction. *The world journal of men's health* 32, 1-17.
- Agca, Y., Critser, J.K., 2002. Cryopreservation of spermatozoa in assisted reproduction, *Seminars in reproductive medicine*, Copyright© 2002 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel.:+ 1 (212) 584-4662, pp. 015-024.
- Aitken, j., fisher, h., 1994. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa - the balance of benefit and risk. *Bioessays* 16, 259-267.
- Al Ahmad, M.Z.A., Chatagnon, G., Amirat-Briand, L., Moussa, M., Tainturier, D., Anton, M., Fieni, F., 2008. Use of glutamine and low density lipoproteins isolated from egg yolk to improve buck semen freezing. *Reproduction in Domestic Animals* 43, 429-436.

- Alvarenga, M.A., Keith, S.L., Landim-Alvarenga, F.C., Squires, E.L., 2000a. Alternative cryoprotectors for freezing stallion spermatozoa, International congress on animal reproduction and artificial insemination, p. 157.
- Alvarenga, M.A., Landim-Alvarenga, F.C., Moreira, R.M., Cesarino, M.M., 2000b. Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. *Equine veterinary journal* 32, 541-545.
- Alvarez, J.G., Storey, B.T., 1983. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid-peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biology of reproduction* 29, 548-555.
- Alvarez, J.G., Storey, B.T., 1989. Role of superoxide-dismutase in protecting rabbit spermatozoa from O<sub>2</sub> toxicity due to lipid-peroxidation. *Gamete Research* 23, 77-90.
- Alvarez, j.g., storey, b.t., 1995. Differential incorporation of fatty-acids into and peroxidative loss of fatty-acids from phospholipids of human spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* 42, 334-346.
- Amann, R.P., Pickett, B.W., 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science* 7, 145-173.
- Anchordoguy, T., Carpenter, J.F., Loomis, S.H., Crowe, J.H., 1988a. Mechanisms of interaction of amino-acids with phospholipid-bilayers during freezing. *Biochimica Et Biophysica Acta* 946, 299-306.
- Anchordoguy, T., Crowe, J.H., Griffin, F.J., Clark Jr, W.H., 1988b. Cryopreservation of sperm from the marine shrimp *Sicyonia ingentis*. *Cryobiology* 25, 238-243.
- Anchordoguy, T.J., Rudolph, A.S., Carpenter, J.F., Crowe, J.H., 1987. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology* 24, 324-331.
- Aranguren-Mendez, J., Jordana, J., Gomez, M., 2001. Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers. *Genetics Selection Evolution* 33, 433 - 442.
- Arruda, R.P., Vieira, R.C., Barbosa, R.T., Manzano, A., 1989. Características Seminais de equídeos destinados a seleção para a congelação. *Rev Bras Reprod Anim (Supl. 1)* 214.
- Ashwood-Smith, M.J., 1987. Mechanisms of cryoprotectant action, *Symposia of the Society for Experimental Biology*, p. 395.

- Atessahin, A., Bucak, M.N., Tuncer, P.B., Kizil, M., 2008. Effects of anti-oxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freeze-thawing process. *Small Ruminant Research* 77, 38-44.
- Aurich, C., 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 89, 65-75.
- Ball, B.A., 1998. An introduction to the use and implication of cryopreserved equine semen, EQUINE ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY WORKSHOP, Davis, CA, pp. 25-43.
- Ball, B.A., 2008. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science* 107, 257-267.
- Ball, B.A., Vo, A., 2001. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. *J Androl* 22, 1061-1069.
- Barker, C.A.V., Gandier, J.C.C., 1957. Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. *Canadian journal of comparative medicine and veterinary science* 21, 47.
- Baumber, J., Ball, B.A., Linfor, J.J., Meyers, S.A., 2003a. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *Journal of Andrology* 24, 621-628.
- Baumber, J., Sabeur, K., Vo, A., Ball, B.A., 2003b. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. *Theriogenology* 60, 1239-1247.
- Bencharif, D., Amirat-Briand, L., Garand, A., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., Langlois, M.-L., Barrière, P., Destrumelle, S., Vera-Munoz, O., Tainturier, D., 2012. The advantages of using a combination of LDL and glutamine in comparison with TRIS egg yolk and Equex® STAMP extenders in the cryopreservation of canine semen. *Research in Veterinary Science* 93, 440-447.
- Bennetts, L.E., Aitken, R.J., 2005. A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* 71, 77-87.
- Betteridge, D.J., 2000. What is oxidative stress? *Metabolism* 49, 3-8.
- Blanchard, T.L.T.L., 2003. *Manual of equine reproduction*. Mosby.
- Brito, L., 2007. Evaluation of Stallion Sperm Morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice* 6:, *Clinical Techniques in Equine Practice* pp. 6: 249-264.

- Bucak, M.N., Atessahin, A., Varish, O., Yuce, A., Tekin, N., Akcay, A., 2007. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen - Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology* 67, 1060-1067.
- Bucak, M.N., Atessahin, A., Yuce, A., 2008. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. *Small Ruminant Research* 75, 128-134.
- Bucak, M.N., Tekin, N., 2007. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research* 73, 103-108.
- Bucak, M.N., Tuncer, P.B., Sariozkan, S., Ulutas, P.A., 2009. Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities. *Small Ruminant Research* 81, 13-17.
- Cabrita, E., Ma, S., Diogo, P., Martinez-Paramo, S., Sarasquete, C., Dinis, M.T., 2011. The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. *Animal Reproduction Science* 125, 189-195.
- Caiza De La Cueva, F.I., Rigau, T., Pujol, R., Piedrafita, J., Rodriguez-Gil, J.E., 1997. Resistance to hyperosmotic stress in boar spermatozoa: the role of the ionic pumps and the relationship with cryosurvival. *Anim Reprod Sci* 48, 301-315.
- Calamera, J.C., Fernandez, P.J., Buffone, M.G., Acosta, A.A., Doncel, G.F., 2001. Effects of long-term in vitro incubation of human spermatozoa: functional parameters and catalase effect. *Andrologia* 33, 79-86.
- Canisso, I.F., Carvalho, G.R., Morel, M.D., Ker, P.G., Rodrigues, A.L., Silva, E.C., da Silva, M.A.C., 2011. Seminal parameters and field fertility of cryopreserved donkey jack semen after insemination of horse mares. *Equine Veterinary Journal* 43, 179-183.
- Castejón, F.C., 2005. Estudio de la congelación del semen e inseminación artificial en el asno zamorano-leonés. Tese, Facultad de Veterinaria - Universidad Complutense de Madrid.
- Chen, Y., Foote, R.H., Brockett, C.C., 1993. Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood-serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology* 30, 423-431.

- Chenier, T., Merckies, K., Leibo, S., Plante, C., Johnson, W., 1998. Evaluation of cryoprotective agents for use in the cryopreservation of equine spermatozoa, AAEP Proceedings, pp. 5-6.
- Chow, P.Y.W., White, I.G., Pickett, B.W., 1986. Stallion sperm and seminal plasma phospholipids and glycerylphosphorylcholine. *Animal Reproduction Science* 11, 207-213.
- Chu, T.M., Aspinall, D., Paleg, L.G., 1974. Stress Metabolism. VI.\* Temperature Stress and the Accumulation of Proline in Barley and Radish. *Functional Plant Biology* 1, 87-97.
- Contri, A., De Amicis, I., Veronesi, M.C., Faustini, M., Robbe, D., Carluccio, A., 2010. Efficiency of different extenders on cooled semen collected during long and short day length seasons in Martina Franca donkey. *Animal Reproduction Science* 120, 136-141.
- Contri, A., Gloria, A., Robbe, D., De Amicis, I., Carluccio, A., 2012. Characteristics of donkey spermatozoa along the length of the epididymis. *Theriogenology* 77, 166-173.
- Cortes-Gutierrez, E.I., Crespo, F., Gosalvez, A., Davila-Rodriguez, M.I., Lopez-Fernandez, C., Gosalvez, J., 2008. DNA fragmentation in frozen sperm of *Equus asinus*: Zamorano-Leones, a breed at risk of extinction. *Theriogenology* 69, 1022-1032.
- Cortes-Gutierrez, E.I., Crespo, F., Serres-Dalmau, C., de las Rozas, A.L.G., Davila-Rodriguez, M.I., Lopez-Fernandez, C., Gosalvez, J., 2009. Assessment of Sperm DNA Fragmentation in Stallion (*Equus caballus*) and Donkey (*Equus asinus*) Using the Sperm Chromatin Dispersion Test. *Reproduction in Domestic Animals* 44, 823-828.
- Costa, A.L., Martins-Bessa, A., de Andrade, A.R., Guimarães, T., Rebordão, M.R., Gamboa, S., Bravo, P.P., Correia, M.J., Colaço, J., Gaivão, I., Rocha, A., 2012. Single Layer Centrifugation with Androcoll-E<sup>TM</sup>; improved progressive motility and percentage of live spermatozoa with intact acrosome of chilled stallion semen but did not have an effect on DNA integrity. *Open Journal of Animal Sciences* 02, 159-165.
- Cottorello, A.C.P., Amancio, R.C., Henry, M., Borges, I., 2002. Effect of storage temperature and extenders on "in vitro" activity of donkey spermatozoa. *Theriogenology* 58, 325-328.
- Crespo, F., Gosalvez, J., Gutiérrez-Cepeda, L., Serres, C., Johnston, S.D., 2013a. Colloidal centrifugation of stallion semen results in a reduced rate of sperm DNA fragmentation. *Reprod. Domest. Anim.* 48, e23-e25.



- Crespo, F., Gutiérrez-Cepeda, L., Gosalvez, J., Serres, C., Johnston, S.D., 2013b. Colloidal centrifugation of stallion semen results in a reduced rate of sperm DNA fragmentation. *Reproduction in Domestic Animals* 48, e23-e25.
- D'Occhio, M.J., Hengstberger, K.J., Johnston, S.D., 2007. Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. *Animal Reproduction Science* 101, 1-17.
- Dalimata, A.M., Graham, J.K., 1997. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. *Theriogenology* 48, 831-841.
- De Leeuw, F.E., Chen, H.-C., Colenbrander, B., Verkleij, A.J., 1990. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology* 27, 171-183.
- Del Maestro, R.F., 1980. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta physiologica Scandinavica. Supplementum* 492, 153-168.
- Delamirande, E., Gagnon, C., 1992. Reactive oxygen species and human spermatozoa .1. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *Journal of Andrology* 13, 368-378.
- Dorado, J., Acha, D., Gálvez, M.J., Ortiz, I., Carrasco, J.J., Díaz, B., Gómez-Arrones, V., Calero-Carretero, R., Hidalgo, M., 2013a. Sperm motility patterns in Andalusian donkey (*Equus asinus*) semen: Effects of body weight, age, and semen quality. *Theriogenology*.
- Dorado, J., Acha, D., Ortiz, I., Gálvez, M.J., Carrasco, J.J., Díaz, B., Gómez-Arrones, V., Calero-Carretero, R., Hidalgo, M., 2013b. Relationship between conventional semen characteristics, sperm motility patterns and fertility of Andalusian donkeys (*Equus asinus*). *Animal Reproduction Science* 143, 64-71.
- Dorado, J., Acha, D., Ortiz, I., Gálvez, M.J., Carrasco, J.J., Gómez-Arrones, V., Calero-Carretero, R., Hidalgo, M., 2014. Effect of extender and amino acid supplementation on sperm quality of cooled-preserved Andalusian donkey (*Equus asinus*) spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 146, 79-88.
- Dorado, J., Rodríguez, I., Hidalgo, M., 2007. Cryopreservation of goat spermatozoa: comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. *Theriogenology* 68, 168-177.

- El-Sheshtawy, R.I., El-Sisy, G.A., El-Nattat, W.S., 2008. Use of selected amino acids to improve buffalo bull semen cryopreservation. *Global Veterinaria* 2, 146-150.
- FAO, F.a.A.O.o.t.U.N.-. 2015. Domestic Animal Diversity Information System hosted (DAD-IS).
- Farshad, A., Hosseini, Y., 2013a. The cryoprotective effects of amino acids supplementation on cooled and post-thaw Markhoz bucks semen quality. *Small Ruminant Research* 114, 258-263.
- Farshad, A., Hosseini, Y., 2013b. The cryoprotective effects of amino acids supplementation on cooled and post-thaw Markhoz bucks semen quality. *Small Ruminant Research* 114, 258-263.
- Flesch, F.M., Gadella, B.M., 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 1469, 197-235.
- Ford, W.C.L., 2004. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Human Reproduction Update* 10, 387-399.
- Galisteo, J., Valera, M., Serrano, E.R., Gallastegui, M.H., Gutiérrez, M.G.-A., 1998. Situación actual de la población asnal autóctona española. *Archivos de zootecnia* 47, 523-528.
- Gao, D., Critser, J.K., 2000. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR journal* 41, 187-196.
- Giwerzman, A., Richthoff, J., Hjollund, H., Bonde, J.P., Jepson, K., Frohm, B., Spano, M., 2003. Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters. *Fertility and Sterility* 80, 1404-1412.
- Glazar, A.I., Mullen, S.F., Liu, J., Benson, J.D., Critser, J.K., Squires, E.L., Graham, J.K., 2009. Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. *Cryobiology* 59, 201-206.
- Gloria, A., Contri, A., De Amicis, I., Robbe, D., Carluccio, A., 2011. Differences between epididymal and ejaculated sperm characteristics in donkey. *Animal Reproduction Science* 128, 117-122.
- Gomes, G.M., Jacob, J., Medeiros, A., Papa, F.O., Alvarenga, M.A., 2002. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. *Theriogenology*, 277-279.

- Graham, J.K., Foote, R.H., 1987. Effect of several lipids, fatty acyl chain-length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology* 24, 42-52.
- Griveau, J.F., Dumont, E., Renard, P., Callegari, J.P., Lelannou, D., 1995. Reactive oxygen species, lipid-peroxidation and enzymatic defense systems in human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 103, 17-26.
- Griveau, J.F., Lelannou, D., 1997. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *International Journal of Andrology* 20, 61-69.
- Guthrie, H.D., Liu, J., Critser, J.K., 2002. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biology of reproduction* 67, 1811-1816.
- Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., Nolan, J.P., 1990. Cryopreservation of Mammalian Sperm: What We Ask Them to Survive. *Journal of Andrology* 11, 73-88.
- Heber, U., Tyankova, L., Santarius, K.A., 1971. Stabilization and inactivation of biological membranes during freezing in the presence of amino acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 241, 578-592.
- Heitland, A.V., Jasko, D.J., Squires, E.L., Graham, J.K., Pickett, B.W., Hamilton, C., 1996. Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Journal* 28, 47-53.
- Henry, M., Gastal, E.L., Meira, C., Diaz, A.P., 1987. Características do semen de jumentos da raça nordestina, Congresso brasileiro de reprodução animal, Col. Bras. Reprod. Anim. Belo Horizonte, p. 72.
- Hoffmann, N., Oldenhof, H., Morandini, C., Rohn, K., Sieme, H., 2011. Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified 'good' or 'poor' for freezing. *Animal Reproduction Science* 125, 112-118.
- Holmes, R.P., Goodman, H.O., Shihabi, Z.K., Jarow, J.P., 1992. The taurine and hypotaurine content of human semen. *Journal of andrology* 13, 289-292.
- Holt, W.V., 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53, 47-58.
- Holt, W.V., North, R.D., 1985. Determination of lipid composition and thermal phase transition temperature in an enriched plasma membrane

fraction from ram spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 73, 285-294.

[Http://dad.fao.org/](http://dad.fao.org/), D.A.D.I.S., Accessed July 2, 2014. (Search Form. Link: Breeds; Browsing Options: Population structure and inbreeding (F) for more than one year; Choose a breed: Countries - Spain, Species - Ass, Breeds - Andaluza / Spain; Choose a year: 2013), FAO.

Ijaz, A., Ducharme, R., 1995. Effect of various extenders and taurine on survival of stallion sperm cooled to 5 degrees C. *Theriogenology* 44, 1039-1050.

Isachenko, E., Isachenko, V., Katkov, I.I., Rahimi, G., Schöndorf, T., Mallmann, P., Dessole, S., Nawroth, F., 2004. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Human Reproduction* 19, 932-939.

Karow, A.M., 2001. *Cryobiology 2001 for mammalian embryologists*. Augusta, Georgia, USA.

Katila, T., Combes, G.B., Varner, D.D., Blanchard, T.L., 1997.

Comparison of three containers used for the transport of cooled stallion semen. *Theriogenology* 48, 1085-1092.

Khelifaoui, M., Battut, I., Bruyas, J.F., Chatagnon, G., Trimeche, A., Tainturier, D., 2005. Effects of glutamine on post-thaw motility of stallion spermatozoa: an approach of the mechanism of action at spermatozoa level. *Theriogenology* 63, 138-149.

Kodama, H., Kuribayashi, Y., Gagnon, C., 1996. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. *Journal of Andrology* 17, 151-157.

Kreuchauf, A., 1984. Reproductive physiology in the jackass. *Anim Res Dev* 20, 51-78.

Kruuv, J., Glofcheski, D.J., 1990. Survival of mammalian-cells following multiple freeze-thaw cycles ii. Independence of cryoprotection using glutamine with dimethyl-sulfoxide, hydroxyethyl starch, propylene-glycol or glycerol. *Cryo-Letters* 11, 215-226.

Kruuv, j., glofcheski, d.j., 1992. Protective effects of amino-acids against freeze thaw damage in mammalian-cells. *Cryobiology* 29, 291-295.

Kruuv, j., glofcheski, d.j., lepock, j.r., 1988. Protective effect of l-glutamine against freeze thaw damage in mammalian-cells. *Cryobiology* 25, 121-130.

Kundu, C.N., Chakraborty, J., Dutta, P., Bhattacharyya, D., Ghosh, A., Majumder, G.C., 2000. Development of a simple sperm cryopreservation

- model using a chemically defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. *Cryobiology* 40, 117-125.
- Kundu, C.N., Das, K., Majumder, G.C., 2001. Effect of amino acids on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. *Cryobiology* 42, 21-27.
- Ladha, S., 1998. Lipid Heterogeneity and Membrane Fluidity in a Highly Polarized Cell, the Mammalian Spermatozoon. *The Journal of Membrane Biology* 165, 1-10.
- Legha, R.A., Pal, Y., 2012. A comparative study of freezing techniques of jack semen. *Vet. Pract.* 13, 88-89.
- Li, Y.H., Si, W., Zhang, X.Z., Dinnyes, A., Ji, W.Z., 2003. Effect of amino acids on cryopreservation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) sperm. *American Journal of Primatology* 59, 159-165.
- Loomis, S.H., Carpenter, J.F., Crowe, J.H., 1988. Identification of strombine and taurine as cryoprotectants in the intertidal bivalve *Mytilus edulis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 943, 113-118.
- Lopez-Fernandez, C., Crespo, F., Arroyo, F., Fernandez, J.L., Arana, P., Johnston, S.D., Gosalvez, J., 2007. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals - II. The stallion. *Theriogenology* 68, 1240-1250.
- Love, C.C., 2011. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. *Theriogenology* 76, 547-557.
- Macías García, B., Ortega Ferrusola, C., Aparicio, I.M., Miró-Morán, A., Morillo Rodriguez, A., Gallardo Bolaños, J.M., González Fernández, L., Balao da Silva, C.M., Rodríguez Martínez, H., Tapia, J.A., Peña, F.J., 2012. Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa: Effects on membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential. *Theriogenology* 77, 1280-1289.
- Martins-Bessa, A., Rocha, A., Mayenco-Aguirre, A., 2007. Incorporation of taurine and hypotaurine did not improve the efficiency of the Uppsala Equex II extender for dog semen freezing. *Theriogenology* 68, 1088-1096.
- Mazur, P., 1990. Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell biophysics* 17, 53-92.
- Mcintosh, T.J., 1999. Chapter 2 Structure and Physical Properties of the Lipid Membrane, In: Davld W. Deamer, A.K., Douglas, M.F. (Eds.), *Current Topics in Membranes*, Academic Press, pp. 23-47.

- Meizel, S., Lui, C.W., Working, P.K., Mrsny, R.J., 1980. Taurine and hypotaurine - their effects on motility, capacitation and the acrosome reaction of hamster sperm invitro and their presence in sperm and reproductive-tract fluids of several mammals. *Development Growth & Differentiation* 22, 483-494.
- Mello, S.L.V., Henry, M., Souza, M.C., Oliveira, S.M.P., 2000. Effect of split ejaculation and seminal extenders on longevity of donkey semen preserved at 5°C. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia* 52, 372-378.
- Meyers, S.A., 2005. Spermatozoal response to osmotic stress. *Anim Reprod Sci* 89, 57-64.
- Minelli, A., Moroni, M., Martinez, E., Mezzasoma, I., Ronquist, G., 1998. Occurrence of prostasome-like membrane vesicles in equine seminal plasma. *J Reprod Fertil* 114, 237-243.
- Miro, J., Lobo, V., Quintero-Moreno, A., Medrano, A., Pena, A., Rigau, T., 2005. Sperm motility patterns and metabolism in Catalonian donkey semen. *Theriogenology* 63, 1706-1716.
- Miro, J., Taberner, E., Rivera, M., Pena, A., Medrano, A., Rigau, T., Penalba, A., 2009. Effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure of motile sperm cell subpopulations in refrigerated Catalonian donkey semen. *Theriogenology* 72, 1017-1022.
- Morais, R.N.d., Mucciolo, R.G., Viana, W.G., 1994. *Biologia reprodutiva de jumentos. III. Ph, osmolaridade e níveis de eletrólitos no sêmen.* *Brazilian Journal of Veterinary Research and animal science* 31, 145-151.
- Moran, d.m., jasko, d.j., squires, e.l., amann, r.p., 1992. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. *Theriogenology* 38, 999-1012.
- Morrell, j.m., johannisson, a., dalin, a.-m., hammar, l., sandebert, t., rodriguez-martinez, h., 2008. Sperm morphology and chromatin integrity in swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. *Acta veterinaria scandinavica* 50, 1-7.
- Morris, G.J., Faszer, K., Green, J.E., Draper, D., Grout, B.W.W., Fonseca, F., 2007. Rapidly cooled horse spermatozoa: Loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation. *Theriogenology* 68, 804-812.
- Mrsny, r.j., meizel, s., 1985. Inhibition of hamster sperm  $na^+$ ,  $k^+$ -atpase activity by taurine and hypotaurine. *Life sciences* 36, 271-275.

- Muldrew, k., mcgann, l.e., 1994. The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. *Biophysical journal* 66, 532-541.
- Neild, D.M., Gadella, B.M., Chaves, M.G., Miragaya, M.H., Colenbrander, B., Agüero, A., 2003. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology* 59, 1693-1705.
- Nordberg, J., Arnér, E.S.J., 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system1. *Free Radical Biology and Medicine* 31, 1287-1312.
- Ojasti, J., 1993. Utilización de la fauna silvestre en América Latina: situación y perspectivas para un manejo sostenible. *Food & Agriculture Org.*
- Oldenhof, H., Friedel, K., Sieme, H., Glasmacher, B., Wolkers, W.F., 2010. Membrane permeability parameters for freezing of stallion sperm as determined by Fourier transform infrared spectroscopy. *Cryobiology* 61, 115-122.
- Oliveira, J.V., Alvarenga, M.A., Melo, C.M., Macedo, L.M., Dell'Aqua Jr., J.A., Papa, F.O., 2006. Effect of cryoprotectant on donkey semen freezability and fertility. *Animal Reproduction Science* 94, 82-84.
- Ortiz, I., Dorado, J., Morrell, J.M., Crespo, F., Gosálvez, J., Gálvez, M.J., Acha, D., Hidalgo, M., 2015a. Effect of single-layer centrifugation or washing on frozen-thawed donkey semen quality: Do they have the same effect regardless of the quality of the sample? *Theriogenology* 84, 294-300.
- Ortiz, I., Dorado, J., Morrell, J.M., Crespo, F., Gosálvez, J., Gálvez, M.J., Acha, D., Hidalgo, M., 2015b. Effect of single-layer centrifugation or washing on frozen-thawed donkey semen quality: Do they have the same effect regardless of the quality of the sample? *Theriogenology* 84, 294-300.
- Parks, j.e., lynch, d.v., 1992. Lipid-composition and thermotropic phase-behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 29, 255-266.
- Peña, a.i., barrio, f., quintela, l.a., herradón, p.g., 1998. Proline and glycine betaine in a diluent for freezing canine spermatozoa. *Reproduction in domestic animals* 33, 5-9.
- Peña, F.J., Macías García, B., Samper, J.C., Aparicio, I.M., Tapia, J.A., Ortega Ferrusola, C., 2011. Dissecting the molecular damage to stallion

- spermatozoa: The way to improve current cryopreservation protocols? *Theriogenology* 76, 1177-1186.
- Peris, S.I., Morrier, A., Dufour, M., Bailey, J.L., 2004. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: Relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. *Journal of Andrology* 25, 224-233.
- Phetudomsinsuk, K., Sirinarumitr, K., Choothesa, A., Suthanmapinunt, P., Kornkaewrat, K., Laikul, A., Amornsak, S., Pinyopummin, A., 2009. Freezability of Thai Native Crossbred Horse Semen in Different Extenders. *Thai Journal of Veterinary Medicine* 39, 105-114.
- Pickett, B.W., Amann, R.P., 1993. Cryopreservation of semen. *Equine reproduction*, 769-789.
- Pickett, B.W., Burwash, L.D., Voss, J.L., Back, D.G., 1975. Effect of seminal extenders on equine fertility. *Journal of animal science* 40, 1136-1143.
- Pickett, B.W., Faulkner, L.C., Seidel, G.E., Berndtson, W.E., Voss, J.L., 1976. Reproductive Physiology of the Stallion. IV. Seminal and Behavioral Characteristics I. *Journal of Animal Science* 43, 617-625.
- Pommer, A.C., Rutlant, J., Meyers, S.A., 2002. The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. *Theriogenology* 58, 1373-1384.
- Quinn, P.J., 1989. Principles of membrane stability and phase-behavior under extreme conditions. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 21, 3-19.
- Renard, P., Grizard, G., Griveau, J.F., Sion, B., Boucher, D., Ielannou, D., 1996. Improvement of motility and fertilization potential of postthaw human sperm using glutamine. *Cryobiology* 33, 311-319.
- Robertson, L., Watson, P.F., 1986. Calcium transport in diluted or cooled ram semen. *Journal of reproduction and fertility* 77, 177-185.
- Rossier, B.C., Geering, K., Kraehenbuhl, J.P., 1987. Regulation of the sodium-pump - how and why. *Trends in Biochemical Sciences* 12, 483-487.
- Rota, A., Furzi, C., Panzani, D., Camillo, F., 2004. Studies on motility and fertility of cooled stallion spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals* 39, 103-109.
- Rota, A., Magelli, C., Panzani, D., Camillo, F., 2008. Effect of extender, centrifugation and removal of seminal plasma on cooled-preserved Amiat donkey spermatozoa. *Theriogenology* 69, 176-185.



- Rota, A., Panzani, D., Sabatini, C., Camillo, F., 2012. Donkey jack (*Equus asinus*) semen cryopreservation: Studies of seminal parameters, post breeding inflammatory response, and fertility in donkey jennies. *Theriogenology* 78, 1846-1854.
- Saleh, R.A., Agarwal, A., 2002. Oxidative stress and male infertility: From research bench to clinical practice. *Journal of Andrology* 23, 737-752.
- Samper, J.C., 2009. Equine breeding management and artificial insemination. Elsevier Health Sciences.
- Sanchez Partida, L.G., Maxwell, W.M.C., Paleg, L.G., Setchell, B.P., 1992. Proline and glycine betaine in cryoprotective diluents for ram spermatozoa. *Reproduction Fertility and Development* 4, 113-118.
- Sanchez-Partida, L.G., Setchell, B.P., Maxwell, W.M.C., 1997. Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. *Reproduction Fertility and Development* 9, 689-696.
- Sanchez-Partida, L.G., Setchell, B.P., Maxwell, W.M.C., 1998. Effect of compatible solutes and diluent composition on the post-thaw motility of ram sperm. *Reproduction Fertility and Development* 10, 347-357.
- Sangeeta, S., Arangasamy, A., Kulkarni, S., Selvaraju, S., 2015. Role of amino acids as additives on sperm motility, plasma membrane integrity and lipid peroxidation levels at pre-freeze and post-thawed ram semen. *Animal Reproduction Science* 161, 82-88.
- Sarıözkan, S., Bucak, M.N., Tuncer, P.B., Ulutaş, P.A., Bilgen, A., 2009. The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. *Cryobiology* 58, 134-138.
- Sergeie, M., Laforest, G., Bujan, L., Bissonnette, F., Bleau, G., 2005. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Human Reproduction* 20, 3446-3451.
- Serres, 2003. Evaluación y Conservación del semen en el asno Zamorano-Leonés, Facultad de Veterinaria., Universidad Complutense de Madrid.
- Serres, C., Álvarez, A.L., Rodríguez, A., Santiago, I., Mateos, E., Gómez-Cuétral, C., 2004. Effect of extender and glycerol concentration on cryopreservation of semen from the Zamorano-Leonés donkey. *Reprod Domest Anim* 39, 267.
- Shafik, A., Shafik, A.A., Shafik, I., El Sibai, O., 2006. Sperm DNA fragmentation. *Archives Of Andrology* 52, 197-208.

- Singer, S.J., Nicolson, G.L., 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731.
- Squires, E.L., Keith, S.L., Graham, J.K., 2004. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* 62, 1056-1065.
- Stephens, T.D., Brooks, R.M., Carrington, J.L., Cheng, L., Carrington, A.C., Porr, C.A., Splan, R.K., 2013. Effects of Pentoxifylline, Caffeine, and Taurine on Post-Thaw Motility and Longevity of Equine Frozen Semen. *Journal of Equine Veterinary Science* 33, 615-621.
- Stewart, G.R., Lee, J.A., 1974. The role of proline accumulation in halophytes. *Planta* 120, 279-289.
- Storey, K.B., Storey, J.M., 1990. Frozen and alive. *Scientific American* 263, 92-97.
- Tamargo, C.J.d.l.F., A. Rodríguez, S.S. Pérez-Garnelo, A. Fernández, J.M. Benito; C.O.Hidalgo, 2009. Creación en Asturias de un banco de germoplasma de razas autóctonas. *Archivos de Zootecnia* 58, 529-532.
- Trimeche, A., Renard, P., Ielannou, D., Barriere, P., Tainturier, D., 1996. Improvement of motility of post-thaw Poitou jackass sperm using glutamine. *Theriogenology* 45, 1015-1027.
- Trimeche, A., Renard, P., Tainturier, D., 1998. A procedure for Poitou jackass sperm cryopreservation. *Theriogenology* 50, 793-806.
- Trimeche, A., Yvon, J.M., Vidament, M., Palmer, E., Magistrini, M., 1999. Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 52, 181-191.
- Upreti, G.C., Jensen, K., Munday, R., Duganzich, D.M., Vishwanath, R., Smith, J.F., 1998. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. *Animal Reproduction Science* 51, 275-287.
- Upreti, G.C., Jensen, K., Oliver, J.E., Duganzich, D.M., Munday, R., Smith, J.F., 1997. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. *Animal Reproduction Science* 48, 269-278.
- Urbano, M., Dorado, J., Ortiz, I., Morrell, J.M., Demyda-Peyrás, S., Gálvez, M.J., Alcaraz, L., Ramírez, L., Hidalgo, M., 2013. Effect of cryopreservation and single layer centrifugation on canine sperm DNA fragmentation assessed by the sperm chromatin dispersion test. *Animal reproduction science* 143, 118-125.

- Uysal, O., Bucak, M.N., Yavas, L., Varish, O., Gurcan, I.S., 2005. Evaluation of ram sperm frozen with various taurine concentrations. *Indian Veterinary Journal* 82, 1059-1061.
- Vidament, M., Vincent, P., Martin, F.-X., Magistrini, M., Blesbois, E., 2009. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. *Animal Reproduction Science* 112, 22-35.
- Waltraud, K., Hans-Peter Grunenfelder, H.-P., Broxham, E., 2008. Donkey breeds in Europe, In: Europe, M.I.f.R.B.a.S.i. (Ed.), St. Gallen, Switzerland.
- Watson, P.F., 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development* 7, 871-891.
- Watson, P.F., 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 60-61, 481-492.
- Watson, P.F., Martin, I.C.A., 1972. A comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility* 28, 99-101.
- Wilborn, R.R., Pugh, D.G., 2011. Donkey Reproduction. *Equine Reproduction* 2, 2835-2838.
- Withers, I.a., King, P.j., 1979. Proline - novel cryoprotectant for the freeze preservation of cultured-cells of *zea-mays-l*. *Plant physiology* 64, 675-678.
- Wolfe, J., Bryant, G., 1999. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane- solute-water systems. *Cryobiology* 39, 103-129.
- Zahn, F.S., Papa, F.O., Dell'aqua Jr, J.A., 2002. Cholesterol incorporation on equine sperm membrane: effects on post-thaw sperm parameters and fertility. *Theriogenology* 58, 237-240.
- Zini, a., delamirande, e., gagnon, c., 1993. Reactive oxygen species in semen of infertile patients - levels of superoxide dismutase-like and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *International Journal of Andrology* 16, 183-188.

## TABLES

Table 1. Osmotic pressure and pH values in the freezing extenders

Freezing extender	Osmotic pressure ( <i>mOsm/kg</i> )	pH
Gent <sup>®</sup> A	312	6.73
Gent-EG <sup>a</sup>	470	6.70
Gent-EG + 20 mM glutamine	544	6.57
Gent-EG + 40 mM glutamine	574	6.55
Gent-EG + 60 mM glutamine	597	6.53
Gent-EG + 20 mM proline	532	6.61
Gent-EG + 40 mM proline	571	6.62
Gent-EG + 60 mM proline	594	6.63
Gent-EG + 20 mM taurine	553	6.60
Gent-EG + 40 mM taurine	561	6.57
Gent-EG + 60 mM taurine	596	6.55

<sup>a</sup>Gent-EG = Gent<sup>®</sup> A + 1% (v:v) ethylene glycol

Table 2. Mean values ( $\pm$  SEM) of sperm morphology, acrosome integrity, membrane integrity, and sperm motility evaluated by the Sperm Class Analyzer system, in three ejaculates collected from six Andalusian donkeys ( $n = 18$ ) and nine pooled semen samples of donkeys (two ejaculates per pool) of frozen-thawed semen in Gent<sup>®</sup> EG supplemented with different concentrations (0, 20, 40, or 60 mM) of glutamine (Glu), proline (Pro) and taurine (Tau)

Parameters	Fresh semen	Frozen-thawed samples									
		Control	Glu 20	Glu 40	Glu 60	Pro 20	Pro 40	Pro 60	Tau 20	Tau 40	Tau 60
MOT (%) <sup>a</sup>	88.9 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	47.3 $\pm$ 2.3 <sup>bcd</sup>	38.3 $\pm$ 1.7 <sup>e</sup>	43.4 $\pm$ 2.9 <sup>cde</sup>	51.8 $\pm$ 3.3 <sup>b</sup>	39.6 $\pm$ 2.2 <sup>e</sup>	42.8 $\pm$ 1.6 <sup>de</sup>	42.0 $\pm$ 1.9 <sup>de</sup>	39.6 $\pm$ 2.3 <sup>e</sup>	40.3 $\pm$ 2.3 <sup>e</sup>	49.8 $\pm$ 3.1 <sup>bc</sup>
PMOT (%) <sup>b</sup>	82.9 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	36.4 $\pm$ 2.0 <sup>bc</sup>	29.0 $\pm$ 1.7 <sup>c</sup>	34.2 $\pm$ 2.8 <sup>cd</sup>	41.9 $\pm$ 4.2 <sup>bc</sup>	30.4 $\pm$ 2.2 <sup>d</sup>	32.8 $\pm$ 2.6 <sup>d</sup>	32.5 $\pm$ 2.0 <sup>d</sup>	28.4 $\pm$ 3.0 <sup>d</sup>	31.5 $\pm$ 2.7 <sup>d</sup>	42.5 $\pm$ 3.7 <sup>b</sup>
VCL ( $\mu$ m/s)	195.8 $\pm$ 7.0 <sup>a</sup>	75.1 $\pm$ 3.8 <sup>c</sup>	85.0 $\pm$ 4.2 <sup>bc</sup>	92.1 $\pm$ 4.5 <sup>bc</sup>	94.7 $\pm$ 5.1 <sup>b</sup>	88.5 $\pm$ 3.4 <sup>bc</sup>	89.8 $\pm$ 5.5 <sup>bc</sup>	89.3 $\pm$ 3.8 <sup>bc</sup>	87.6 $\pm$ 5.6 <sup>bc</sup>	87.1 $\pm$ 4.5 <sup>bc</sup>	101.9 $\pm$ 9.1 <sup>b</sup>
VSL ( $\mu$ m/s)	127.6 $\pm$ 5.4 <sup>a</sup>	64.0 $\pm$ 3.9 <sup>c</sup>	73.5 $\pm$ 4.0 <sup>bc</sup>	79.5 $\pm$ 4.1 <sup>bc</sup>	82.9 $\pm$ 4.8 <sup>b</sup>	76.8 $\pm$ 3.3 <sup>bc</sup>	77.4 $\pm$ 5.4 <sup>bc</sup>	77.1 $\pm$ 3.6 <sup>bc</sup>	76.4 $\pm$ 5.2 <sup>bc</sup>	75.8 $\pm$ 4.5 <sup>bc</sup>	87.1 $\pm$ 7.2 <sup>b</sup>
VAP ( $\mu$ m/s)	168.5 $\pm$ 7.3 <sup>a</sup>	64.0 $\pm$ 3.9 <sup>c</sup>	79.3 $\pm$ 4.2 <sup>bc</sup>	86.0 $\pm$ 4.4 <sup>b</sup>	89.2 $\pm$ 5.2 <sup>b</sup>	82.8 $\pm$ 3.6 <sup>b</sup>	84.2 $\pm$ 5.7 <sup>b</sup>	83.8 $\pm$ 3.7 <sup>b</sup>	82.1 $\pm$ 5.7 <sup>b</sup>	81.6 $\pm$ 4.7 <sup>b</sup>	95.2 $\pm$ 8.4 <sup>b</sup>
LIN (%)	65.2 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	64.0 $\pm$ 3.9 <sup>b</sup>	86.4 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	86.2 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	87.4 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	86.8 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	85.9 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	86.3 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	87.2 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	86.9 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	85.7 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>
STR (%)	75.9 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	64.0 $\pm$ 3.9 <sup>c</sup>	92.7 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	92.4 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	92.9 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	92.7 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	91.9 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	92.0 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	93.1 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	92.9 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	91.8 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>
WOB (%)	85.8 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>	64.0 $\pm$ 3.4 <sup>c</sup>	93.2 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	93.3 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	94.1 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	93.5 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	93.5 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	93.8 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	93.6 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	93.5 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	93.4 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>
ALH ( $\mu$ m)	3.7 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	1.5 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	1.7 $\pm$ 0.04 <sup>bc</sup>	1.8 $\pm$ 0.06 <sup>bc</sup>	1.8 $\pm$ 0.04 <sup>bc</sup>	1.7 $\pm$ 0.03 <sup>bc</sup>	1.8 $\pm$ 0.02 <sup>bc</sup>	1.7 $\pm$ 0.04 <sup>bc</sup>	1.7 $\pm$ 0.05 <sup>bc</sup>	1.7 $\pm$ 0.03 <sup>bc</sup>	1.9 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>
BCF (Hz)	8.2 $\pm$ 0.5 <sup>ab</sup>	7.2 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	8.1 $\pm$ 0.2 <sup>ab</sup>	8.6 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	8.0 $\pm$ 0.2 <sup>ab</sup>	8.1 $\pm$ 0.1 <sup>ab</sup>	8.1 $\pm$ 0.2 <sup>ab</sup>	7.8 $\pm$ 0.2 <sup>ab</sup>	8.2 $\pm$ 0.2 <sup>ab</sup>	8.0 $\pm$ 0.1 <sup>ab</sup>	8.9 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>
ASM (%)	5.9 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	6.2 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	14.3 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	11.7 $\pm$ 1.9 <sup>ab</sup>	9.8 $\pm$ 2.2 <sup>ab</sup>	13.3 $\pm$ 2.7 <sup>a</sup>	12.8 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	13.1 $\pm$ 2.6 <sup>a</sup>	13.2 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	12.5 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	10.6 $\pm$ 1.2 <sup>ab</sup>
AIS (%)	81.5 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	59.0 $\pm$ 2.5 <sup>c</sup>	50.2 $\pm$ 0.9 <sup>d</sup>	58.7 $\pm$ 2.2 <sup>c</sup>	66.4 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>	42.3 $\pm$ 2.3 <sup>e</sup>	53.7 $\pm$ 3.1 <sup>cd</sup>	56.4 $\pm$ 2.9 <sup>cd</sup>	49.5 $\pm$ 1.4 <sup>d</sup>	56.5 $\pm$ 1.6 <sup>cd</sup>	56.7 $\pm$ 2.2 <sup>cd</sup>
MIS (%)	91.7 $\pm$ 1.5 <sup>ab</sup>	93.6 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>	74.1 $\pm$ 3.9 <sup>d</sup>	77.7 $\pm$ 3.3 <sup>cd</sup>	85.6 $\pm$ 3.4 <sup>abc</sup>	71.7 $\pm$ 2.7 <sup>d</sup>	80.0 $\pm$ 2.5 <sup>cd</sup>	77.1 $\pm$ 3.8 <sup>cd</sup>	74.5 $\pm$ 4.3 <sup>d</sup>	80.5 $\pm$ 2.6 <sup>cd</sup>	83.7 $\pm$ 3.6 <sup>bc</sup>

<sup>a</sup>Total motility is defined as the percentage of spermatozoa with a mean velocity > 10  $\mu$ m/s

<sup>b</sup>Progressive motility is defined as the percentage of spermatozoa with a mean velocity > 90  $\mu$ m/s and straightness > 75%

MOT- total motility; PMOT- progressive motility; VCL- curvilinear velocity; VSL- straight line velocity; VAP- average path velocity; LIN- linearity; STR- straightness; WOB- wobble; ALH- amplitude of lateral head displacement; BCF- beat cross frequency; ASM- Abnormal sperm morphology; AIS- Acrosome-intact spermatozoa; MIS- Membrane-intact spermatozoa. Different superscript letters (a-f) in the same row indicate differences ( $P < 0.05$ )

Table 3. Mean ( $\pm$  SEM) DNA fragmentation index (sDFI) values associated with the extender treatments and regression analysis of sDFI vs. incubation time (immediately after thawing (T0) and after 6h (T6) and 24 h (T24) of incubation)

Treatment	sDFI			Slope	Y-axis Intercept
	T0	T6	T24		
Control	23.32 $\pm$ 3.46	38.09 $\pm$ 1.53 <sup>a</sup>	62.04 $\pm$ 8.66 <sup>a</sup>	1.56 $\pm$ 0.30	<b>25.49<math>\pm</math>4.19<sup>a</sup></b>
Glu20	17.88 $\pm$ 1.73	31.75 $\pm$ 2.09 <sup>ab</sup>	46.86 $\pm$ 3.70 <sup>b</sup>	1.11 $\pm$ 0.16	<b>21.18<math>\pm</math>2.36<sup>bc</sup></b>
Glu40	16.09 $\pm$ 2.77	30.82 $\pm$ 1.90 <sup>ab</sup>	46.34 $\pm$ 2.54 <sup>b</sup>	1.18 $\pm$ 0.16	<b>19.38<math>\pm</math>2.15<sup>bc</sup></b>
Glu60	13.51 $\pm$ 1.92	28.62 $\pm$ 2.09 <sup>b</sup>	45.63 $\pm$ 2.22 <sup>b</sup>	1.23 $\pm$ 0.14	<b>17.11<math>\pm</math>2.01<sup>c</sup></b>
Pro20	17.93 $\pm$ 2.25	35.84 $\pm$ 1.45 <sup>ab</sup>	53.74 $\pm$ 4.17 <sup>ab</sup>	1.39 $\pm$ 0.18	<b>22.04<math>\pm</math>2.44<sup>ab</sup></b>
Pro40	17.71 $\pm$ 1.93	34.90 $\pm$ 2.94 <sup>ab</sup>	46.71 $\pm$ 3.94 <sup>b</sup>	1.07 $\pm$ 0.20	<b>22.63<math>\pm</math>2.76<sup>bc</sup></b>
Pro60	19.67 $\pm$ 2.17	32.87 $\pm$ 2.83 <sup>ab</sup>	46.23 $\pm$ 1.53 <sup>b</sup>	1.02 $\pm$ 0.14	<b>22.92<math>\pm</math>2.02<sup>bc</sup></b>
Tau20	15.96 $\pm$ 1.90	31.58 $\pm$ 2.47 <sup>ab</sup>	44.62 $\pm$ 2.61 <sup>b</sup>	1.09 $\pm$ 0.15	<b>19.86<math>\pm</math>2.18<sup>c</sup></b>
Tau40	14.13 $\pm$ 2.03	28.00 $\pm$ 3.65 <sup>b</sup>	47.37 $\pm$ 3.43 <sup>b</sup>	1.32 $\pm$ 0.19	<b>16.67<math>\pm</math>2.52<sup>c</sup></b>
Tau60	18.12 $\pm$ 2.00	32.17 $\pm$ 2.86 <sup>ab</sup>	42.52 $\pm$ 1.67 <sup>b</sup>	0.95 $\pm$ 0.16	<b>21.47<math>\pm</math>2.04<sup>bc</sup></b>
P-value	0.1014	0.0337	0.0414	0.3264	0.0438

Treatments: *Control*- Gent-EG; Glu20- Gent-EG + 20 mM glutamine; Glu40- Gent-EG + 40 mM glutamine; Glu60- Gent-EG + 60 mM glutamine; Pro20- Gent-EG + 20 mM proline; Pro40- Gent-EG + 40 mM proline; Pro60- Gent-EG + 60 mM proline; Tau20- Gent-EG + 20 mM taurine; Tau40- Gent-EG + 40 mM taurine; Tau60- Gent-EG + 60 mM taurine.

Different superscript letters represent significant differences between treatments ( $P < 0.05$ ) at each time point.

Significant different intercepts ( $P < 0.05$ ) are shown in bold.