



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**ESTUDO DOS DANOS MORFOFUNCIONAIS CAUSADOS
PELA CRIOPRESERVAÇÃO NO SÊMEN DE TATU-PEBA,
Euphractus sexcinctus WAGLER, 1830.**

PATRÍCIA DA CUNHA SOUSA

Médica Veterinária

MOSSORÓ – RN
2013



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**ESTUDO DOS DANOS MORFOFUNCIONAIS CAUSADOS
PELA CRIOPRESERVAÇÃO NO SÊMEN DE TATU-PEBA,
Euphractus sexcinctus WAGLER, 1830.**

PATRÍCIA DA CUNHA SOUSA

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva - UFERSA

MOSSORÓ – RN
2013

**Ficha catalográfica preparada pelo setor de classificação e
catalogação da Biblioteca “Orlando Teixeira” da UFERSA**

S725c Sousa, Patrícia da Cunha.

Estudo dos danos morfofuncionais causados pela
criopreservação no sêmen de tatu-peba, *Euphractus sexcinctus*
Wagler, 1830./ Patrícia da Cunha Sousa – Mossoró-RN, 2011.

125f. il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade
Federal Rural do Semi-Árido.

Orientador: Prof.º Dr. Alexandre Rodrigues Silva

1.Xenartra. 2.Dasipodidae. 3.Células espermáticas.
4.Congelação seminal. I.Título.

CDD: 636.1

Bibliotecária: Marilene Santos de Araújo
CRB5 1013

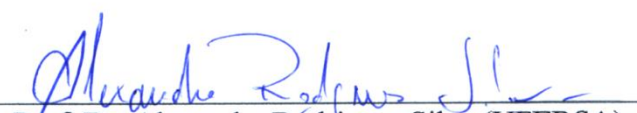
PATRÍCIA DA CUNHA SOUSA

**ESTUDO DOS DANOS MORFOFUNCIONAIS CAUSADOS
PELA CRIOPRESERVAÇÃO NO SÊMEN DE TATU-PEBA,
Euphractus sexcinctus WAGLER, 1830.**

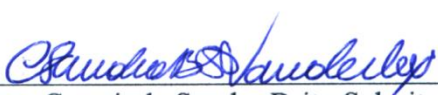
Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

APROVADA EM: 30 / 08 / 2013

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva (UFERSA)
Presidente


Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira (UFERSA)
Primeiro membro


Prof (a). Dra. Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley (UECE)
Segundo membro

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

PATRÍCIA DA CUNHA SOUSA – Nascida no Município de Fortaleza-CE no dia 28.10.1979, filha de Francisco das Chagas de Sousa e Maria Lilian da Cunha de Sousa, concluiu o Ensino Médio no Colégio Marista de Aracati - CE. Graduiu-se em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN) em 2005.1, exercendo, em seguida, durante o período de 2005 a 2007, a função de professora de Biologia na Escola Estadual de Ensino Médio Professor Gabriel Epifânio dos Reis, situada no município de Icapuí-CE. Em 2006 iniciou o curso de Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), graduando-se em fevereiro de 2011. Nesta instituição, ainda na graduação, foi estagiária do Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal (LCGA) por 3 anos, onde desenvolveu trabalhos com biotecnologia do sêmen em diferentes espécies silvestres. Em agosto de 2011 foi selecionada pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pela UFERSA, sendo colaboradora na disciplina de Fisiopatologia da Reprodução do curso de Medicina Veterinária desta mesma instituição. Durante todo o ano de 2012 prestou serviços à Prefeitura Municipal de Icapuí-CE, como Coordenadora do Departamento de Vigilância à Saúde, desempenhando atividades nos setores de Epidemiologia, Endemias e Vigilância Sanitária.

*Aos meus pais, Francisco das
Chagas e Maria Lilian, e ao meu esposo
(Novais Neto), pelo amor desprendido e
incondicional que me impulsiona.*

Dedico.

“Tudo posso Naquele que me fortalece”
Fil 4:13

AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo, a Deus, por me inspirar, e me sustentar, nos muitos momentos de desânimo. Agradeço a Ele por me proporcionar a existência e me conduzir por um caminho tão cheio de dádivas! Por me fazer sentir a sutileza poderosa de Sua presença através de eventos muitas vezes tão rotineiros, mas que Ele tem me dado a sensibilidade para senti-Lo. Sendo assim, todas as pessoas e todos os momentos citados aqui, na forma de agradecimento e lições, entendo plenamente como expressões de Deus em minha vida.

Agradeço aos meus professores:

O orientador, Alexandre Rodrigues Silva, pela oportunidade de ouro de estar sob sua orientação em grande parte da minha vida acadêmica. Agradeço pelas exigências, pelas correções, pela cooperação constante em todas as etapas deste trabalho, e de tantos outros de grande êxito. Aprendi muito com você, e ao longo dessa convivência vi que é possível existir colaboração em um ambiente que poderia ser competitivo. Então, deixo aqui registrado o meu completo reconhecimento pelo grande profissional e pessoa que és. Irei sempre tê-lo como referência nessa minha “caminhada científica”, na qual ainda tenho muito a percorrer. Obrigada de coração por ter me aberto as portas.

Ao professor Carlos Iberê Alves Freitas, pelo seu apoio em ceder gentilmente o acesso aos animais, peças fundamentais deste estudo. Também, deixo aqui registrado o meu agradecimento, ao professor José Domingues Fontenele Neto, pela parceria com as análises da fluorescência, por ter sido tão solícito e presente durante as avaliações. Ao professor Moacir Franco, que sem sua cooperação preciosa, disponibilidade e humildade, não teríamos realizado as imagens de Microscopia Eletrônica. Você é um grande ser humano! Agradeço ainda, ao professor Jean Berg Alves Freitas, coordenador do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal (UFERSA), pela atenção em todas as vezes que precisei! Agradeço também à professora Dra. Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley (UECE) por ter aceitado gentilmente o convite de participar da minha banca, e ao CAPES pela concessão da bolsa.

Agradeço aos companheiros do Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal (LCGA) que participaram ativamente deste estudo, especialmente: Erika Santos, Ana Liza Souza (Aninha), Gabriela Liberalino (Gaby), Gislayne Peixoto (Gy), Thibério Castelo, Artur Brilhante e Andréia Silva. Também aos que se dispuseram a ajudar sempre que necessário: Livia Campos, Pedro Borges, Camila Gurgel, e Constância. Absolutamente NADA teria sido realizado sem a ajuda de vocês. Não tenho como dimensionar a minha gratidão. Obrigada LCGA! Mas, além da colaboração técnica, agradeço, mais ainda, pelos anos de convivência e os laços de amizade que foram estabelecidos, por compartilharem comigo momentos mágicos (e não tão mágicos) da minha vida! Queria deixar meu agradecimento especial a Erika, Artur, Andréia e Valesca Luz...vocês sabem a razão!

Agradeço também a companhia constante dos meus amigos e irmãos: Rociene Abrantes, Adriene Rosceli, Sávio Bessa, Manuella Rocha e Wanessa Basílio, por todos os momentos compartilhados e muitos outros que estão por vir! Quero vocês sempre em minha vida!

Agradeço a toda minha família, mas principalmente:

Aos meus pais, a quem nenhuma palavra e nenhum texto aqui escritos serão suficientes para externar o quanto eu lhes sou grata. Vocês são o meu porto seguro, a quem devo tudo de mim. Obrigada por tanta dedicação, por me doarem esse amor genuíno...Obrigada por serem minha base, meu conforto. Perdoem as minhas muitas ausências, e o isolamento necessário... Amo vocês com o meu mais profundo amor!

A “titia” Laurice (Ir. Laurice), minha tia e madrinha, pelas orações, pelos conselhos, pela calma e sabedoria. A sua presença é muito importante em minha vida!

Ao meu esposo, meu companheiro, meu amigo, meu Príncipe, meu presente valioso de Deus! Obrigada amor, por me ajudar, por ser paciente e compreensivo, por saber esperar e me dar a tranquilidade necessária para conclusão desta importante etapa da minha vida! Te amo...“Juntos até ficarmos velhinhos”.

ESTUDO DOS DANOS MORFOFUNCIONAIS CAUSADOS PELA CRIOPRESERVAÇÃO NO SÊMEN DE TATU-PEBA, *Euphractus sexcinctus* WAGLER, 1830.

SOUSA, Patrícia da Cunha. **Estudo dos danos morfofuncionais causados pela criopreservação no sêmen de tatu-peba, *Euphractus sexcinctus* Wagler, 1830.** 2013.124f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Morfofisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2013.

RESUMO: Objetivou-se com este trabalho, criopreservar o sêmen de tatus-peba, avaliando previamente os efeitos da centrifugação e da diluição sobre seus os parâmetros seminais ao longo do teste de termorresistência (TTR), a fim de definir o melhor diluente a ser utilizado no processo de criopreservação seminal desta espécie. Amostras de sêmen (n=12) oriundas de 04 machos adultos coletados por eletroejaculação foram divididas em quatro alíquotas, sendo duas imediatamente diluídas em Tris ou água de coco em pó (ACP-119[®]), e as demais centrifugadas (800 g/10 min) previamente à diluição. As amostras foram incubadas a 34 °C por 3 h, e os parâmetros seminais avaliados em intervalos de 1 h. Em termos gerais, observou-se uma melhor eficiência do Tris quanto à preservação dos parâmetros seminais ao longo do TTR, principalmente até os 120 min de avaliação, mas após este período, os dois diluentes se equipararam. Ainda, verificou-se efeito deletério da centrifugação sobre a qualidade do sêmen de tatus-peba, não sendo esse método indicado para esta espécie. Para a criopreservação, o sêmen de tatus-peba foi então diluído em solução a base de Tris, acrescida de 20 % de gema e 3 % de glicerol. Após as etapas de diluição, refrigeração e descongelação, foi realizada a análise clássica das amostras simultânea à análise por fluorescência, empregando a associação de fluoróforos para avaliar a integridade da membrana plasmática (Iodeto de Propídio - PI e Hoechst - H-342), e também a atividade mitocondrial (CMXRos - Mito Tracker red[®]). A maioria das alterações observadas em todos os estágios da criopreservação do sêmen de tatus-peba foi secundária, mas as proporções desses defeitos aumentaram significativamente a partir da etapa de refrigeração, sendo maior após a descongelação, devido aos impactos do choque térmico e do estresse osmótico serem mais expressivos nessa fase. Os resultados da análise de fluorescência indicaram um percentual de células com a membrana plasmática intacta maior (8,4 %) do que o de células móveis (6,1 %), em sêmen descongelado. Isto pode ser devido à ação da gema de ovo em permitir maior integridade estrutural a algumas células. Em imagens captadas por eletromicroscopia de transmissão foram identificados, em espermatozoides criopreservados, ruptura e vesiculação da membrana plasmática, anormalidades mitocondriais, como também modificações nucleares e acrossomal caracterizadas por alterações da cromatina e capacitação espermática, respectivamente. Este estudo é o primeiro relato sobre a utilização da criopreservação em sêmen de xenartras, e dada a importância desta biotécnica para a preservação do material genético de tatus, os resultados aqui obtidos são fundamentais para promover o aperfeiçoamento da criopreservação seminal em tatus-peba, visando sua aplicação em outras espécies de tatus ameaçadas ou vulneráveis à extinção.

Palavras-chave: Xenartra, Dasipodidae, células espermáticas, congelação seminal.

CRIOPRESERVATION OF SEMEN OF SIX-BANDED ARMADILLO (*Euphractus sexcinctus*): STUDY OF DAMAGE MORPHOFUNCTIONAL CAUSED SPERM CELLS

SOUSA, Patrícia da Cunha. **Study of morphological and functional damage caused by cryopreservation in semen of six banded armadillo, *Euphractus sexcinctus* Wagler, 1830.** 2013.124f. Thesis (Master degree In Animal Science: Morphophysiology and Biotechnology of Animal Reproduction) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2013.

ABSTRACT: The objective of this work, cryopreserve semen from six-banded armadillos, assessing in advance the effects of centrifugation and dilution of their seminal parameters over thermoresistance test (TRT) in order to define the best diluent to be used in semen cryopreservation of this species. Semen samples (n = 12) derived from 04 adult males collected by electroejaculation were divided into four aliquots, two immediately diluted in Tris or powdered coconut water (ACP-119[®]), and the other centrifuged (800 g/10 min) prior to dilution. The samples were incubated at 34 °C for 3 h and the seminal parameters evaluated at intervals of 1 h. In general, was observed greater efficiency of Tris regard to the preservation of seminal parameters along the TRT, especially up to 120 min of evaluation, but after this period the two extenders were equivalents. Still, the centrifugation caused deleterious effect on semen quality of six-banded armadillos, this method is not suitable for this species. For the cryopreservation of the semen of six banded armadillos, was then diluted in Tris-base, plus 20 % egg yolk and 3 % glycerol. Following the steps of dilution, the samples semen cooling and thawing was performed classical analysis simultaneously to fluorescence analysis, employing the combination of fluorophores to assess the plasma membrane integrity (Propidium iodide - PI and Hoechst - H-342), and also mitochondrial activity (CMXRos - Mito Tracker red[®]). Most of the changes observed in all stages of cryopreservation of semen of six-banded armadillos was secondary, but the proportions of these defects increased significantly from step cooling, and higher in step thawing, due to the impacts of heat shock and osmotic stress be more significant in this phase. The results of fluorescence analysis indicated a percentage of cells with intact plasma membrane more higher (8.4 %) than that of motile cells (6.1 %) on thawed semen. This may be due to the action of egg yolk, to provide greater structural integrity to some cells. In images taken by transmission electron microscopy were identified in sperm cryopreserved rupture and vesiculation of the plasma membrane, mitochondrial abnormalities, as well nuclear and acrosomal changes characterized by changes in chromatin and sperm capacitation, respectively. This study is the first report on the use of cryopreservation on semen xenarthras, and given the importance of biotech to preserve the genetic material of armadillos, the results obtained here are fundamental to promote the improvement of semen cryopreservation in six-banded armadillos, aiming its applications in other species of armadillos endangered or vulnerable to extinction.

Key-words: Xenarthra, Dasypodidae, sperm cells, seminal freezing.

LISTAS DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
~	Semelhante
'	Minuto
<	Menor
=	Igual
>	Maior
±	Mais ou menos
×	Vezes
®	Marca registrada
°C	Grau Celsius
μL	Microlitro
λ	Comprimento de onda
10 ⁶	Milhões
ACP	Água de coco em pó
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
Ax	Axonema
BM	Bainha mitocondrial
Ca ⁺⁺	Íon cálcio
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CEMAS	Centro de Multiplicação de Animais Silvestres
CFDA	Diacetato de Carboxifluoresceína
CitC	Citocromo C
cm	Centímetro
CMXRos	Cloreto de 8-(4-clorometil) fenil 2,3,5,6,11,12,14,15 octahidro-1 H, 4H, 10H, 13H-diquinolisino-8H-xantílio (MitoTracker red [®])
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)
DPBS	Solução tamponada salina de Dulbeco
em	Emissão
EP	Erro Padrão

EQ	Meio padrão equino
ex	Excitação
FITC	Isotiocionato de fluoresceína
<i>g</i>	Gravidade
g	Gramma
H	Hidrogênio
h	Hora
H33258	Tri-hidrocloreto bisbenzimidaz
H-342	Hoechst 3342
HOST	Teste hiposmótico (Hypoosmotic Swelling Test)
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IP	Iodeto de Propídio
IUCN	União Internacional para Conservação da natureza (International Union for Conservation of Nature)
Kg	Kilograma
Kv	Kilo Volt
LGM	Lactose-gema-modificado
M	Molar
mA	Miliampere
MAE	Membrana Acrossomal Externa
MAI	Membrana Acrossomal Interna
MET	Microscópio Eletrônico de Transmissão
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
mg	Miligrama
min	Minuto
Mit	Mitocôndria
mL	Mililitro
MMC	Meio de mínima contaminação
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
mOsm/L	Miliosmol por litro
MP	Membrana Plasmática
n	Número

N	Núcleo
N ₂	Nitrogênio líquido
nm	Nanômetro
O	Oeste
P	Valor p (nível descritivo)
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Peça intermediária
PNA	Aglutinina de amendoim (Peanut Agglutinin)
PSA	Aglutinina <i>Pisum sativum</i> (<u><i>Pisum Sativum</i></u> Agglutinin)
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio (Reactive Oxygen Species)
S	Sul
SMAY	Sabouraud, maltose, agar e levedura
TES	Tris - Trihidroximetil aminoetano sulfônico
Tris	Tris - trihidroximetil amino metano
TTR	Teste de termorresistência
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semiárido
UV	Ultravioleta
V	Volt

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Médias ($\pm$ EP) das características do sêmen fresco (<i>in natura</i>) de tatus-peba (<i>E. sexcinctus</i>) (n=3 ejaculados/animal).....	106
Tabela 2 – Médias ($\pm$ EP) dos parâmetros seminais de tatu-peba (<i>E. sexcinctus</i>) a partir das diferentes etapas da criopreservação.....	107
Tabela 3 – Médias ($\pm$ EP) da integridade da membrana plasmática e função mitocondrial de espermatozoides de tatus-peba (<i>E. sexcinctus</i>), após análise por fluorescência.....	107
Tabela 4 – Médias ($\pm$ EP) das alterações espermáticas de tatu-peba (<i>E. sexcinctus</i>) observadas em diferentes etapas da criopreservação.....	109

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tatu-peba (<i>Euphractus sexcinctus</i> Wagler, 1830).....	27
Figura 2 - Distribuição geográfica (em amarelo) do tatu-peba, <i>Euphractus sexcinctus</i> (Wagler, 1830).....	28
Figura 3 - Região dorsal do tatu-peba (<i>Euphractus sexcinctus</i> Wagler, 1830) indicando 7 (sete) cintas móveis (setas) e 3 (três) glândulas odoríferas (círculo) inseridas na carapaça.....	29
Figura 4 - Tatu-peba (<i>Euphractus sexcinctus</i> Wagler, 1830) macho.....	30
Figura 5 - Tatu-peba (<i>Euphractus sexcinctus</i> Wagler, 1830) fêmea. A – Par de tetas na região superior ventral torácica. B - Detalhe da genitália da fêmea com clitóris expandido (seta), seguido pelo orifício urogenital, e mais adiante, próximo à base da cauda, pelo ânus.....	30
Figura 6 - <i>Rouleaux</i> espermáticos de tatu-peba (<i>Euphractus sexcinctus</i> Wagler, 1830) identificados através de esfregaços corados com rosa de bengala (Aumento 1000×).....	32
Figura 7 - Diferentes mecanismos de ação dos fluoróforos com afinidade ao DNA utilizados para determinar a integridade estrutural da membrana plasmática. A seta verde (pontilhada) indica o comportamento do fluoróforo caboxifluoresceína (CFDA) utilizado para marcar espermatozoides com membrana plasmática intacta, mostrando também a ocorrência da desacilação, modificando a configuração da molécula do corante, impedindo que esta atravessasse a membrana de volta ao meio extracelular. A seta vermelha (contínua) mostra o iodeto de propídio, indicador de membrana plasmática lesionada, impedido de chegar até o DNA através da membrana plasmática intacta, sendo isso possível apenas se esta apresentar alguma descontinuidade.....	54
Figura 8 - Esquema do mecanismo de ação do fluoróforo Mito Tracker red [®] , mostrando sua afinidade à membrana mitocondrial interna (<i>MMI</i>) ativa (seta pontilhada vermelha), caracterizada pela produção de adenosina trifosfato (ATP) e presença da proteína citocromo C (CitC).....	56
Figura 9 - Valores (média $\pm$ dp) referentes à motilidade (A), e vigor (B) em sêmen de tatus-peba (<i>Euphractus sexcinctus</i> – n = 12 ejaculados derivados de 04 indivíduos) durante teste de termorresistência com diluentes Tris e ACP-119 [®] associados ou não à centrifugação (C*).....	88
Figura 10 - Valores (média $\pm$ dp) referentes à integridade estrutural de membrana determinada com azul de bromofenol (A) e integridade funcional de membrana determinada pelo teste hiposmótico (B) em sêmen de tatus-peba (<i>Euphractus sexcinctus</i> – n = 12 ejaculados derivados de 04 indivíduos) durante teste de termorresistência com diluentes Tris e ACP-119 [®] associados ou não à centrifugação (C*).....	89

Figura 11 - Integridade de membrana plasmática e atividade mitocondrial de espermatozoides criopreservados de tatus-peba avaliados através da associação dos fluorescentes H3342/IP/ Mito traker red®. (A) Espermatozoides marcados em azul com o fluoróforo Hoechst 3342 (H-342) e peça intermediária fluorescente em vermelho, coradas com Mito traker red®, indicado respectivamente membrana plasmática íntegra e presença de atividade mitocondrial. A seta indica espermatozoide com membrana plasmática íntegra, mas sem atividade mitocondrial. (B) Espermatozoides marcados em vermelho com iodeto de propídio (IP), indicando dano à membrana, e marcados em azul com o H-342, indicando integridade de membrana, porém não apresentam peça intermediária fluorescendo em vermelho pelo Mito Traker red®, indicando ausência de atividade mitocondrial. (C) Espermatozoides em “rouleaux”, com membranas plasmáticas íntegras e atividade mitocondrial. (Aumento 400×)..... 108

Figura 12 - Micrografias por MET da região da cabeça de espermatozoides obtidas a partir de amostras de sêmen fresco-diluído (grupo controle) e congelados-descongelados de tatus-peba (*E. sexcinctus*). (A) Espermatozoide normal (grupo controle) com membranas plasmática ligeiramente ondulada, com limites bem definidos entre o núcleo e o acrossoma. (B) Espermatozoide apresentando pontos eletrolucos entre o núcleo (N) e a membrana acrossomal interna (setas vermelhas). (C) Acrossomo membranas indefinidas, indicando capacitação. (D) Espermatozoide criopreservado em secção longitudinal, mostrando ruptura e vacuolização da membrana plasmática; (E) deformação da cabeça espermática (formato falciforme), apresentando aparente dano nuclear (seta) adjacente ao acrossomo capacitado..... 110

Figura 13 - Micrografias por MET da região da cauda de espermatozoides obtidas a partir de amostras de sêmen fresco-diluído (grupo controle) e congelados-descongelados de tatus-peba (*E. sexcinctus*). (A) Corte tangencial/longitudinal da peça intermediária do espermatozoide, mostrando mitocôndrias normais com cristas inseridas em matriz homogênea (grupo controle). (B) Corte tangencial/longitudinal da peça intermediária de espermatozoide congelado-descongelado, contendo mitocôndrias lesionadas com matriz heterogênea (setas). (C) Corte transversal da peça intermediária espermática, mostrando mitocôndrias normais e bem delimitadas (grupo-controle). (D) Corte transversal da peça intermediária espermática, mostrando crioinjúrias às mitocôndrias (setas) (E) bainha mitocondrial (BM) com matriz heterogênea ao longo de toda a peça intermediária (PI), e descontinuidade de membrana (seta) na região do colo (*). (MAI) Membrana acrossomal interna; (MP) Membrana plasmática; (MAE) Membrana acrossomal externa; (N) Núcleo; (PI) Peça intermediária; (BM) Bainha mitocondrial; (Ax) Axonema; (Mit) Mitocôndria..... 111

SUMÁRIO

	página
1 CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	25
1.1 INTRODUÇÃO.....	25
1.2 REVISÃO DE LITERATURA.....	26
1.2.1 O tatu-peba (<i>Euphractus sexcinctus</i>).....	26
1.2.1.1 Taxonomia e aspectos gerais.....	26
1.2.1.2 Aspectos reprodutivos.....	30
1.2.1.2.1 Características seminais.....	31
1.2.2 Tecnologia de sêmen aplicada em tatus.....	33
1.2.3 Processamento do sêmen.....	34
1.2.3.1 Centrifugação.....	34
1.2.3.2 Diluentes seminais.....	35
1.2.3.2.1 Tris	36
1.2.3.2.2 Água de coco em pó - ACP®	37
1.2.3.3 Crioprotetores.....	38
1.2.4 Criopreservação do sêmen.....	40
1.2.4.1 Crioinjúrias.....	42
1.2.4.1.1 Danos às membranas plasmáticas e acrossomais.....	43
1.2.4.1.2 Danos mitocondriais.....	44
1.2.4.1.3 Danos ao citoesqueleto.....	45
1.2.4.1.4 Danos nucleares.....	45
1.2.5 Avaliação do Sêmen.....	46
1.2.5.1 Análise clássica do sêmen.....	46
1.2.5.1.1 Motilidade e vigor.....	47
1.2.5.1.2 Integridade estrutural e funcional da membrana espermática.....	47
1.2.5.1.3 Análise morfológica.....	48
1.2.5.2 Análises complementares.....	49
1.2.5.2.1 Teste de termorresistência (TTR).....	49
1.2.5.2.2 Análise ultraestrutural.....	50
1.2.5.2.3 Avaliação espermática por fluorescência.....	52
1.2.5.2.3.1 Membrana plasmática.....	53

1.2.5.2.3.2 Atividade mitocondrial.....	55
1.2.6 Justificativa.....	57
1.2.7 Hipóteses científicas.....	58
1.2.8 Objetivos.....	59
1.2.8.1 Geral.....	59
1.2.8.2 Específicos.....	59
1.2.9 Referências.....	60
 2 CAPÍTULO 2 – EFEITOS DA CENTRIFUGAÇÃO SOBRE A VIABILIDADE DO SÊMEN DE TATUS-PEBA (<i>Euphractus sexcinctus</i>).....	 82
2.1 RESUMO.....	83
2.2 ABSTRACT.....	83
2.3 INTRODUÇÃO.....	84
2.4 MATERIAL E MÉTODO.....	85
2.5 RESULTADOS.....	87
2.6 DISCUSSÃO.....	90
2.7 COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA.....	92
2.8 REFERÊNCIAS.....	92
 3 CAPÍTULO 3 – PRIMEIRA TENTATIVA DE CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE TATUS-PEBA (<i>Euphractus sexcinctus</i>): ESTUDO DAS CRIOINJÚRIAS ESPERMÁTICAS.....	 97
3.1 RESUMO.....	98
3.2 ABSTRACT.....	99
3.3 INTRODUÇÃO.....	100
3.4 MATERIAL E MÉTODO.....	101
3.4.1 Animais.....	101
3.4.2 Contenção dos animais.....	102
3.4.3 Coleta de sêmen.....	102
3.4.4 Avaliação clássica.....	102
3.4.5 Criopreservação.....	103
3.4.6 Análise de viabilidade.....	103
3.4.7 Análise ultraestrutural.....	104

3.4.8 Análise estatística.....	105
3.5 RESULTADOS.....	105
3.6 DISCUSSÃO.....	111
3.7 REFERÊNCIAS.....	116
 4 PERSPECTIVAS.....	 123
 ANEXOS.....	 124
ANEXO 1 – CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO “EFEITOS DA CENTRIFUGAÇÃO SOBRE A VIABILIDADE DO SÊMEN DE TATUS-PEBA (<i>EUPHRACTUS SEXCINCTUS</i>) EM DILUENTES À BASE DE TRIS E ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP-119 [®])” À REVISTA <i>CIÊNCIA RURAL</i>	124
ANEXO 3 – DILUIÇÕES E PREPARO DAS SONDAS FLUORESCENTES.....	125

1 CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 INTRODUÇÃO

O *Euphractus sexcinctus* (WAGLER, 1830), popularmente conhecido como tatu-peba ou tatu-cascudo, pertence à superordem Xenartra. É considerada resistente aos distúrbios ambientais e antrópicos, sendo amplamente distribuída na América do Sul (MEDRI, 2008). Apesar dos efeitos de perda de hábitat devido ao desmatamento (MCDONOUGH e LOUGHRY, 2001) e à caça frequente em virtude do consumo da sua carne (FALLABRINO e CASTIÑEIRA, 2006), esta espécie não está listada entre os animais ameaçados ou em perigo de extinção (IUCN, 2013). Assim, sugere-se a sua utilização como modelo experimental para aplicação de biotécnicas reprodutivas em outras espécies do mesmo grupo, as quais se encontram atualmente ameaçadas, como o tatu-bola (*Tolypeutes tricinctus*) e o tatu-canastra (*Priodontes maximus*) (CITES, 2013).

Mesmo diante da ampla distribuição, ainda são poucos os estudos realizados no intuito de conhecer a fisiologia reprodutiva dos tatus-peba e demais membros da ordem Xenartra. Nos machos, as informações estão basicamente direcionadas à análise do sêmen (HEATH et al., 1987; PERES et al., 2008; SERAFIM et al., 2010; SANTOS et al., 2011). Esses conhecimentos são importantes para melhor aplicação de biotécnicas reprodutivas nos programas de conservação das espécies, e entre estas se destaca a criopreservação de sêmen (ANDRABI e MAXWELL, 2007).

Em animais silvestres, os estudos acerca desse aspecto vêm avançando consideravelmente mostrando que a criopreservação é uma técnica válida, podendo contribuir associada à inseminação artificial, para preservação de espécies consideradas ameaçadas ou em probabilidade de extinção, ou ainda em programas de multiplicação de espécies silvestres em cativeiro com fins de produção sustentável (SA-ARDRIT et al., 2006).

Nesse contexto, nenhum estudo foi ainda realizado em tatus, sendo, portanto, necessário o desenvolvimento de protocolos adequados às características peculiares de seu sêmen. Assim, dada a importância da criopreservação para a conservação das espécies silvestres, objetivou-se testar diferentes diluentes para a criopreservação do sêmen de tatu-peba (*E. sexcinctus*), empregando-se diferentes técnicas de análise para detectar os efeitos danosos desta biotécnica sobre as células espermáticas após descongelação.

1.2 REVISÃO DA LITERATURA

1.2.1 O tatu-peba (*Euphractus sexcinctus*)

1.2.1.1 Taxonomia e aspectos gerais

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Classe: Mammalia

Superordem: Xenartra

Ordem: Cingulata

Família: Dasipodidae

Subfamília: Euphractinae

Gênero: *Euphractus*

Espécie: *Euphractus sexcinctus*

O *Euphractus sexcinctus* é a única espécie do gênero *Euphractus* (WAGLER, 1830), sendo popularmente conhecida por tatu-peba ou tatu-amarelo (Figura 1). A espécie é pertencente à superordem Xenartra (Xenon = estranho e Arthros = articulação) e à ordem Cingulata, a qual é exclusiva dos tatus. Esses animais apresentam carapaça e a utilizam como estrutura de defesa contra predadores e danos causados pela vegetação.



Figura 1 - Tatu-peba (*Euphractus sexcinctus* Wagler, 1830).

São animais amplamente distribuídos no leste e centro-sul da América do Sul e leste dos Andes. No Brasil, está presente desde o sul da Amazônia até o restante dos estados (SILVA JUNIOR e NUNES, 2001; GONÇALVES et al., 2006; LIMA et al., 2009) (Figura 2). ANACLETO et al. (2006) em estudos relacionados com a distribuição da espécie no Brasil, sugerem que esta poderia ocorrer em todos os grandes biomas - Amazônia, Cerrado, Caatinga, Pampas, Pantanal e Mata Atlântica - o que a torna a espécies de tatu mais generalista, em relação ao habitat, a ocorrer no país. Assim, por representar uma grande população e ampla distribuição, além de tolerância à modificação do habitat, o *E. sexcinctus* não está qualificado em uma categoria ameaçada (IUCN, 2013).



Figura 2 - Distribuição geográfica (em amarelo) do tatu-peba, *Euphractus sexcinctus* (Wagler, 1830).

Fonte: IUCN (2013).

Na idade adulta, o tatu-peba pode medir mais de 40 cm de comprimento cabeça-corpo, sua cauda pode atingir de 11,9 a 24,1 cm, e a massa corporal varia de 3,2 a 6,5 kg. A carapaça apresenta coloração pardo-amarelada a marrom-clara, alguns pelos esbranquiçados e longos, e 6 a 8 cintas móveis na região mediana (Figura 3). Na região dorsal da cintura pélvica, ocorrem 2 a 4 glândulas odoríferas na carapaça de machos e fêmeas desta espécie (REDFORD e WETZEL, 1985) (Figura 3). A secreção dessas glândulas é provavelmente utilizada para a demarcação de tocas, e também pode ser importante na identificação e na informação da receptividade sexual dos indivíduos (MCDONOUGH e LOUGHRY, 2003). Esta espécie possui cinco dedos em cada membro, todos com garras, sendo o segundo dedo o mais desenvolvido (POCOCK, 1924).

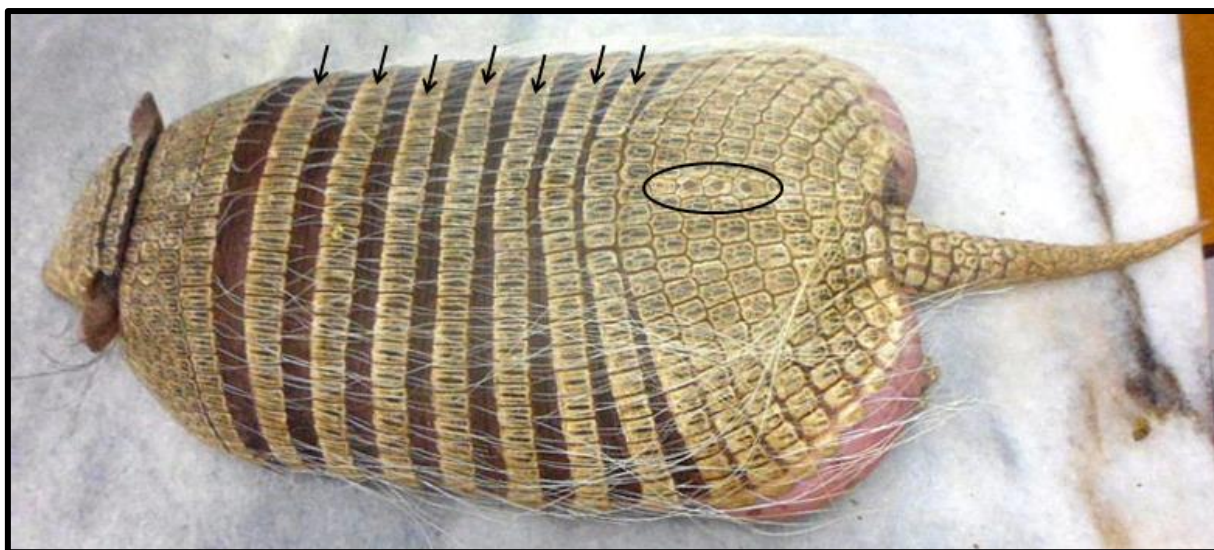


Figura 3- Região dorsal do tatu-peba (*Euphractus sexcinctus* Wagler, 1830) indicando 7 (sete) cintas móveis (setas) e 3 (três) glândulas odoríferas (círculo) inseridas na carapaça.

O *E. sexcinctus* mantém sua temperatura corporal basal em torno de 34 °C sob intervalos de temperaturas ambientes entre 10 e 30 °C (MCNAB, 1980), do mesmo modo que todos os membros da superordem Xenartra (tatus, tamanduás e preguiças), que apresentam temperaturas corporais com média de 34,1 °C, e amplitude de 32,7 a 35,5 °C, as quais são peculiarmente mais baixas em comparação aos demais mamíferos placentários que regulam suas temperaturas entre 36 e 38 °C (MCNAB, 1985).

A espécie tem grande habilidade para cavar tocas, utilizadas para refúgio, conforto térmico e abrigo dos filhotes. Esse hábito também auxilia na procura do alimento, que consiste desde material vegetal, invertebrados até pequenos vertebrados e carniça (REDFORD e WETZEL, 1985; BEZERRA et al., 2001; BONATO, 2002; DALPONTE e TAVARES-FILHO, 2004; ANACLETO et al., 2006). A atividade do tatu-peba é principalmente diurna, entretanto, atividade noturna já foi observada (REDFORD e WETZEL, 1985).

O tatu-peba possui hábito solitário, com exceção da época reprodutiva e da relação da mãe com a prole (MEDRI, 2008). Há registros do agrupamento ocasional desta espécie em outras situações como em torno da carcaça de um animal morto, se alimentando da carne e das larvas presentes nela (NOWAK, 1999). DESBIEZ et al. (2006) registraram o comportamento de perseguição até oito indivíduos, um atrás do outro em fileira. MEDRI (2008) relaciona este fato com a reprodução da espécie, de modo que este comportamento foi observado seguido por cópula.

1.2.1.2 Aspectos reprodutivos

Não há dimorfismo sexual evidente em *E. sexcinctus*, mas o sexo pode ser facilmente determinado pela observação das genitálias. Os tatus machos apresentam um dos pênis mais longos dentre os mamíferos, estendendo-se até cerca de 2/3 do comprimento do corpo em algumas espécies (Figura 4) (MCDONOUGH e LOUGHRY, 2001). A região perianal é longa tanto em machos quanto em fêmeas. Nestas observa-se um par de tetas na região peitoral e um clitóris longo parecido com pênis (Figura 5) (POCOCK, 1924).



Figura 4 - Tatu-peba (*Euphractus sexcinctus* Wagler, 1830) macho.

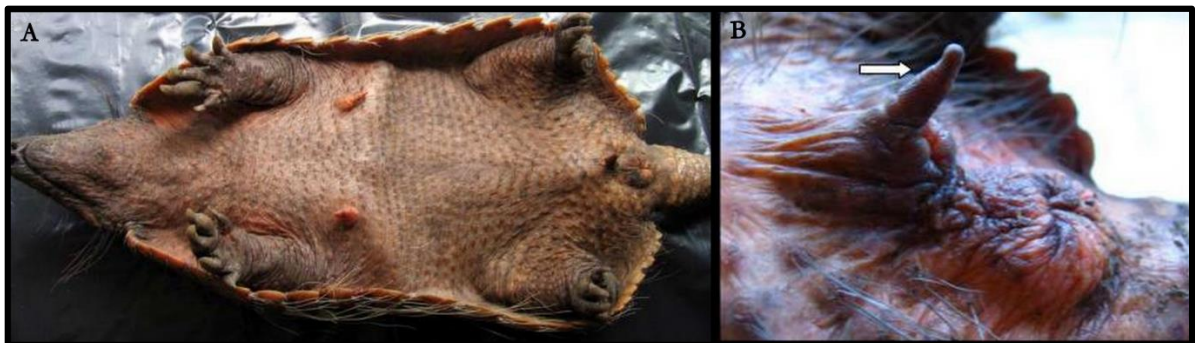


Figura 5 - Tatu-peba (*Euphractus sexcinctus* Wagler, 1830) fêmea. A – Par de tetas na região superior ventral torácica. B - Detalhe da genitália da fêmea com clitóris expandido (seta), seguido pelo orifício urogenital, e mais adiante, próximo à base da cauda, pelo ânus.

Fonte: Medri (2008).

NERIS et al. (2002), em estudo com espécies habitantes da região paraguaia, observaram a época de reprodução do tatu-peba como "primavera e verão", mas indivíduos em cativeiro apresentaram atividades reprodutiva durante o outono. CUÉLLAR (2008) afirma que no Chaco boliviano essa espécie apresenta uma estação de monta curta, concentrada no final da estação seca, com fecundidade máxima nos primeiros meses da estação chuvosa.

Em cativeiro, o período de gestação registrado para a espécie foi entre 60 e 65 dias, e a prole pode ser de um a três filhotes de sexos iguais ou diferentes, que atingem a maturidade em torno de nove meses (GUCWINSKA, 1971).

1.2.1.2.1 Características seminais

Há três características notáveis no sêmen dos tatus-peba: a elevada viscosidade do plasma seminal, a presença comum de agregados espermáticos denominados *rouleaux* (Figura 6) e as grandes dimensões morfométricas da cabeça dos espermatozoides (largura 13 µm e comprimento 10,9 µm, aproximadamente) (SERAFIM et al., 2010; SANTOS et al., 2011; SOUSA et al., 2013). Não se sabe ao certo a razão da elevada viscosidade nesta espécie, mas é provável que essa característica tenha relação com uma alta concentração de glicosaminoglicanos no plasma seminal, proveniente de secreções de glândulas como a próstata ou glândulas vesiculares, conforme descrito para outros mamíferos (CARDOSO et al., 1985). Fatores relacionados com a viscosidade e a formação de coágulo são considerados limitantes durante o processamento do sêmen em outras espécies como camelídeos (MOSAFERI et al., 2005) e primatas (*Cebus apella*) (OLIVEIRA et al., 2011). A fim de reverter essa problemática, foram descritos alguns procedimentos para promover a liquefação do sêmen empregando-se a diluição em soluções como Tris (MOSAFERI et al., 2005) ou água de coco em pó (ACP® - OLIVEIRA et al., 2011), bem como o uso de enzimas (tripsina e hialuronidase) (HERNÁNDEZ-LOPEZ et al., 2002).

Durante a análise clássica do sêmen de tatus-peba, a alta viscosidade seminal causa interferência sobre os resultados de motilidade e, principalmente, sobre o vigor espermático, o qual apresenta valor máximo igual a 2 (dois), em sêmen fresco (SERAFIM et al., 2010; SOUSA et al., 2013). Esse efeito negativo parece ser agravado pela presença dos *rouleaux* espermáticos. Essas formações foram descritas em outra espécie de tatu (*Cabassous unicinctus*) através de imagens por ultramicroscopia (HEATH et al., 1987), mostrando dois ou

mais espermatozoides empilhados. Esses mesmos autores atribuem essa organização ao formato côncavo da cabeça dos espermatozoides, o que facilita o encaixe e a permanência da junção entre essas células.

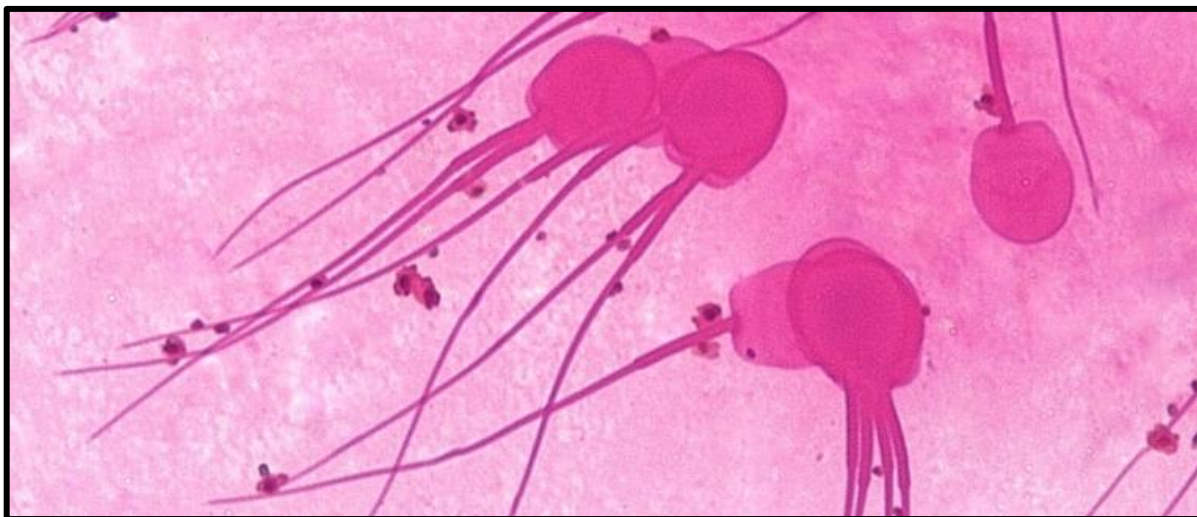


Figura 6 – *Rouleaux* espermáticos de tatu-peba (*Euphractus sexcinctus* Wagler, 1830) identificados através de esfregaços corados com rosa de bengala (Aumento 1000×).

No geral, a estrutura básica dos espermatozoides de tatu-peba é semelhante à descrita para a maioria dos mamíferos; no entanto, nesta espécie, a cabeça espermática apresenta grandes dimensões morfométricas, representando 16,6 % do tamanho total do espermatozoide (SOUSA, et al., 2013). O tatu peludo (*Chaetophractus villosus*) também foi outra espécie descrita como possuidora de grande cabeça espermática, com dimensões representando 17,5 % do tamanho total do espermatozoide (CETICA et al., 1993). Na verdade, a forma da cabeça e o tamanho dos espermatozoides do gênero *Euphractus* parecem ser semelhantes aos relatados para tatus dos gêneros *Chaetopractus* e *Zaedyus*, mas diferentes do que foi descrito para tatus dos gêneros *Dasypus*, *Tolypeutes*, *Priodontes* e *Cabassous*. Essas diferenças podem ser atribuídas a aspectos evolutivos entre os táxons (CETICA et al., 1998). No entanto, a relação filogenética entre representantes da ordem Xenartra e a sua posição na filogenia dos mamíferos eutérios ainda não é completamente elucidada (DELSUC et al., 2003).

1.2.2 Tecnologia de sêmen aplicada em tatus

O registro mais antigo de que se tem conhecimento sobre análise espermática de tatus foi realizado por BEDFORD e MILLAR (1978) na espécie *Dasypus novemcinctus*, com o objetivo de caracterizar as modificações ocorridas nos espermatozoides ao longo do epidídimo utilizando imagens obtidas através da microscopia eletrônica de transmissão. Anos mais tarde, a análise ultraestrutural foi também utilizada por HEATH et al. (1987) para descrever espermatozoides obtidos a partir do ducto deferente de um exemplar de *C. unicinctus*, sendo o primeiro relato sobre a ocorrência do *rouleaux* espermático em tatus.

HERRICK et al. (2002) desenvolveram um procedimento de eletroejaculação para a coleta de sêmen de tatu da espécie *Tolypeutes matacus*. Além disso, este estudo reporta sobre a utilização da associação de sondas fluorescentes (isoticianato de fluoresceína – aglutinina conjugada de *Aechis hypogaea* (FITC-PNA) e Hoechst bisbenzimidaz 33258 (H33258) para avaliar, respectivamente, o *status* acrossomal e a viabilidade dos espermatozoides.

Nos últimos anos, as pesquisas mais recentes relacionadas à tecnologia do sêmen em tatus foram realizadas na espécie *E. sexcinctus*, onde há relatos pioneiros quanto à utilização de eletroejaculação (SERAFIM et al., 2010), a inclusão do teste de termorresistência e do teste hiposmótico para avaliação da qualidade seminal (SANTOS et al., 2011) e a descrição ultraestrutural e morfométrica dos espermatozoides desses indivíduos (SOUSA et al., 2013). AMORIM et al. (2011) testaram diferentes substâncias anestésicas, a fim de estabelecer o melhor protocolo para procedimentos de eletroejaculação em tatus-peba, sugerindo como o mais adequado o uso da associação de xilazina (1 mg/kg) e cetamina (7 mg/kg), por via intramuscular como medicação pré-anestésica, seguida da manutenção do estado anestésico por meio da aplicação intravenosa de propofol (5 mg/kg), por promover melhor analgesia e rápida recuperação dos animais, além de não alterar os valores dos parâmetros seminais, mantendo-os semelhantes aos do grupo controle (sem anestesia). No ano seguinte, foram avaliados nesta mesma espécie, os efeitos de diferentes diluidores (Tris e ACP®) sobre os parâmetros de motilidade, vigor e viabilidade do sêmen refrigerado (5 °C), sendo demonstrado que o sêmen de tatus-peba é sensível às baixas temperaturas, independente dos diluentes testados.

Todas essas referências constituem valiosas bases de dados para o desenvolvimento de tecnologias que possam ser empregadas para a preservação de gametas masculinos de

tatus, os quais poderão constituir bancos de germoplasma animal ou serem aplicados associados à biotécnicas de reprodução assistida, como a inseminação artificial. Até o momento, entretanto, nenhuma pesquisa foi relatada com o intuito de criopreservar o sêmen de tatus-peba.

1.2.3 Processamento do sêmen

Estudos envolvendo outros grupos de mamíferos silvestres utilizam etapas distintas de processamento seminal, as quais podem incluir: prévia centrifugação do sêmen para remoção do plasma seminal, como realizado em catetos (*Pecari tajacu*) (CASTELO et al., 2010a) e em rinocerontes (*Rhinocerus uniconis*) (STOOPS et al., 2010), a escolha de um bom diluente (*Dasiprocta aguti*) (SILVA et al., 2011) acrescido, em casos de criopreservação, de crioprotetores em dosagem ideal (*P. tajacu*) (SILVA et al., 2012) a fim de minimizar os efeitos nocivos às células espermáticas.

1.2.3.1 Centrifugação

Nos mamíferos, o plasma seminal transporta os espermatozoide durante a cópula, porém este não é considerado um meio adequado para o sêmen que será criopreservado (JASKO et al., 1997). Diante desse fato, e de processos de armazenamento ou preservação de espermatozoides, a centrifugação se mostrou eficiente para separar essas células do líquido seminal. Estudos conduzidos por HOE et al. (2001) mostram a necessidade de centrifugação do sêmen canino, com posterior substituição do plasma seminal por diluidores capazes de promover uma melhor preservação das células espermáticas. A centrifugação também concentra a população de espermatozoides para que esta possa ser rediluída em soluções apropriadas (CASTELO et al., 2010a). ALVAREZ-RODRÍGUEZ et al. (2013) utilizaram esse método em ursos marrons (*Ursus arctus*) com a finalidade de concentrar os espermatozoides e remover a contaminação por urina das amostras de sêmen.

Em animais domésticos há relatos de que a sobrevivência e a motilidade de espermatozoides de várias espécies como suínos (STRZEZEK et al., 1992), bovinos (WISHWNATH et al., 1992) caprinos (PELLICER-RUBIO e COMBARNOUS, 1998) e

equinos (CARVER e BALL, 2002), aumentam com a remoção do plasma seminal, devido à retirada de proteínas descritas como nocivas à esses parâmetros espermáticos (BRAUN et al., 1994).

De modo controverso, esse procedimento pode influenciar negativamente sobre a qualidade seminal em outras espécies. Em ursos marrons, apesar de parecer um procedimento necessário, a centrifugação pode ocasionar perda de espermatozoides devido a não sedimentação de parte dessas células após a remoção do sobrenadante. Assim como danos ao acrossoma e efeito negativo sobre a motilidade total dos espermatozoides (ALVAREZ-RODRÍGUEZ et al., 2013). Estudos com ratos (CARDULLO e CONE, 1986) e camundongos (KATKOV e MAZUR, 1998) apresentaram resultados em que a centrifugação foi danosa aos espermatozoides durante o processamento do sêmen. Em humanos (NG et al., 1990), o efeito deletério foi demonstrado, quando o precipitado apresentou espécies reativas de oxigênio (EROs), induzindo danos irreversíveis às células espermáticas e, conseqüentemente, à sua capacidade de fertilização *in vitro* (AITKEN e CLARKSON, 1988).

CASTELO et al. (2010a) demonstraram que a centrifugação reduz a motilidade espermática e aumenta o percentual de defeitos morfológicos, tanto antes quanto depois do processo de criopreservação, no sêmen de catetos. Tais ocorrências tendem a refletir em alterações no percentual de espermatozoides viáveis após a centrifugação, os quais podem ser agravados pelo processo de criopreservação (CASTELO et al., 2010a). O sêmen de outras espécies silvestres, como o rinoceronte indiano (*R. unicornis*) (STOOPS et al., 2010) foi submetido à centrifugação, e apresentou elevado índice de células espermáticas com defeitos morfológicos. Contudo, na citada referência, não foi testada a interferência do processo sobre a qualidade seminal, e a ocorrência desses danos foi relacionada à contaminação do ejaculado por urina. Em espécies de tatus, até o presente momento, não se tem conhecimento sobre a utilização da centrifugação durante o processamento do sêmen.

1.2.3.2 Diluentes seminais

Os diluentes seminais são soluções constituídas por substâncias que permitem a preservação da membrana espermática mediante a presença de macromoléculas que estabilizam as membranas e minimizam as perdas de íons e enzimas. Ainda, essas soluções devem estabilizar o pH do meio (efeito tamponante), neutralizar a ação de produtos tóxicos

produzidos pelos espermatozoides, como o ácido lático; promover proteção contra o choque térmico e manter o equilíbrio eletrolítico e osmótico, além de inibir o crescimento bacteriano, e fornecer energia (ENGLAND, 1993; AMANN e PICKET, 1987).

Ao interagir com as células espermáticas, o diluente deve ainda proporcionar proteção aos diferentes compartimentos celulares quando submetidos ao resfriamento e à congelação-descongelação, preservando a integridade das membranas e a habilidade de fecundação, fatores cruciais que devem ser apresentados pelos espermatozoides após o processo de criopreservação (GRAHAM, 1996; MANJUNATH et al. 2002).

Sobre esse aspecto, a qualidade dos diluentes seminais é um fator crítico para a definição de protocolos de criopreservação, de modo que para o desenvolvimento de um diluente adequado devem ser consideradas as características próprias do ejaculado de cada espécie (ANEL et al., 2010). Há vários relatos sobre meios de diluição para sêmen, e cada um, desde a simples solução salina até os meios tamponados mais complexos, apresentam méritos próprios (CELEGHINI, 2005).

Algumas substâncias são propostas como diluentes seminais (meio padrão equino [EQ] e leite desnatado – gema de ovo – açúcar [SMAY] (STOOPS et al., 2010); meio de mínima contaminação [MMC] e lactose-gema-modificado [LGM] (BARCELLOS et al., 2011); água de coco em pó [ACP] (SILVA et al., 2011); e o tampão Tris [hidroximetil-aminometano] (SILVA et al. 2012), sendo este o mais largamente utilizado.

1.2.3.2.1 Tris

O Tris (hidroximetil-aminometano) é uma substância solúvel em água, disponível comercialmente em um alto grau de pureza na forma de cristais (CHOE et al., 2006), atuando como tampão iônico bipolar em pH entre 7,0 e 9,0 (MCPHAIL e GOODMAN, 1984). KOBER (1995) reportou a partir de estudos com sêmen de diferentes espécies domésticas (suínos, equinos e cães), que o Tris além da ação tamponante, também atua na redução do metabolismo da frutose das células espermáticas, contribuindo para a preservação da energia desses gametas.

Existe um grande número de relatos sobre a utilização do Tris, como diluente em sêmen a ser criopreservado, em espécies domésticas como caprinos (BEZERRA et al., 2012) e búfalos domesticados (*Bubalus bubalis*) (KUMAR e ATREJA, 2012), e também em uma

grande diversidade de espécies mamíferas silvestres. Em veados-mateiros (*Mazama americana*) (FAVORETTO et al., 2012) foi verificada uma menor proporção de alterações celulares em espermatozoide criopreservados quando o detergente Equex foi acrescido ao diluidor Tris-gema; em caprinos selvagens (*Ammotragus lervia sahariensis*) foram analisados dois protocolos de diluição, ambos a base de Tris, já estabelecidos em outras espécies selvagens semelhantes (*Ovis* sp. e *Capra* sp.), conferindo bons resultados na manutenção da integridade acrossomal aquele acrescido de glicose (SANTIAGO-MORENO et al., 2013); em catetos (*P. tajacu*) foram estudadas diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluente a base de Tris, concluindo que este diluente acrescido de 10 % ou 20 % de gema de ovo mais 3 % glicerol foi efetiva para criopreservação seminal desta espécie (ALVES et al., 2013). Além disso, quando comparado a outros diluentes, aqueles a base de Tris apresentaram melhores resultados, como relatado em estudo com macacos-prego (*C. apella*), onde o TES-Tris (3,5 % de glicerol) foi mais adequado para a criopreservação seminal em relação à água de coco em pó (ACP® - 2,5 % de glicerol). O sêmen fresco do tatu-peba já foi anteriormente diluído em Tris para teste de termorresistência, apresentando espermatozoides com membrana intacta até 360 min de avaliação (SANTOS et al., 2011).

1.2.3.2.2 Água de coco em pó - ACP®

De modo alternativo, a água de coco (*Cocos nucifera*) tem sido usada, desde os anos 80 para conservação de células espermáticas (NUNES et al., 1998). Um dos componentes mais importantes da água de coco é o ácido 3-indol-acético, uma auxina que age regulando o crescimento e a divisão celular nos vegetais, fungos e alguns protozoários (NUNES e SALGUEIRO, 1999). O uso dessa auxina apresentou uma ação benéfica sobre a motilidade e espermatozoides móveis sobre sêmen de caprinos e ovinos incubados a 37 °C (NUNES e COMBARNOUS, 1995).

Além disso, por apresentar características como a origem vegetal, o baixo risco de transmissão de doenças, condições físico-químicas adequadas para promover a viabilidade espermática, a disponibilidade de frutos em estágios ideais, e de representar baixo custo financeiro, elaborou-se um meio de conservação à base de água de coco na sua forma em pó (ACP®), desenvolvido pela ACP Biotecnologia, Fortaleza-Ceará, Brasil (BARROS e TONIOLLI, 2011).

A ACP[®] foi obtida por meio de um processo de desidratação e subsequente formulação de meios de conservação específicos para células e tecidos (SALGUEIRO et al., 2002). Os níveis de pH e osmolaridade são ajustados para que se adequem às características seminais de cada espécie, recebendo uma denominação numérica particular. No caso de tatu-peba, encontra-se o ACP[®]-119. Mas, mesmo em osmolaridades diferentes da ideal, os espermatozoides desta espécie responderam a esse meio, fato este comprovado por testes realizados com outras variações desse diluente, como o ACP[®]-300 e o ACP[®]-380, onde os resultados demonstraram percentual de células com integridade estrutural de membrana em torno dos 20 % após 1 h da diluição, em condições de baixas temperaturas (AMORIM et al., 2012).

Em outras espécies de mamíferos silvestres, bons resultados também foram conferidos a partir da diluição do sêmen com ACP[®], sendo solução de escolha na criopreservação de espermatozoides epididimários de cutias (*D. aguti*) (SILVA et al., 2011) e testado em catetos (SILVA et al., 2013). Em ensaio com macacos-prego (*C. apella*), esse diluente, adicionado de cafeína, quando comparado a uma solução Tris-base, demonstrou aumento da motilidade dos espermatozoides, sendo sugestiva a sua utilidade na inseminação artificial de sêmen fresco diluído desta espécie (OLIVEIRA et al., 2011).

1.2.3.3 Crioprotetores

Os crioprotetores são substâncias que promovem proteção aos espermatozoides durante o processo de criopreservação, evitando a formação de gelo extra e intracelular durante o a congelamento, devendo, necessariamente, serem adicionados ao meio diluidor (ARRUDA et al., 2002; MEDEIROS, 2002). Tal efeito protetor está, em geral, associado à redução da concentração de soluto e ao aumento das porções de água descongelada e, portanto, do tamanho dos canais de água no meio extracelular (WATSON, 1995).

Sua eficiência apresenta relação com as seguintes propriedades: baixo peso molecular, alta solubilidade em soluções aquosas eletrolíticas e baixa toxicidade (ALVARENGA et al., 2005). De acordo com a capacidade em atravessar a membrana plasmática, os crioprotetores podem ser classificados em penetrantes e não penetrantes, ou intracelulares e extracelulares (GRAHAM, 1996; ARRUDA, 2000).

Os penetrantes são constituídos por moléculas pequenas que agem nos meios intracelulares e extracelulares, agindo como solvente e soluto, com a capacidade de atravessar a membrana plasmática e controlar a pressão osmótica intra e extracelular. Com ponto de congelação mais baixo que o da água (menor que 0 °C) (DALIMATA e GRAHAM, 1997), a água pura do diluente é a primeira a congelar, formando cristais de gelo e entre estes formam-se canais de água não congelada onde ficam alojados os espermatozoides (PICKETT e AMANN, 1992; JASKO, 1994; GRAHAM, 1996).

Com a congelação da água, ocorre o aumento da concentração de soluto e da osmolaridade do meio extracelular, promovendo o egresso de água da célula. Ao mesmo tempo, ocorre a penetração do crioprotetor na célula, evitando que ocorra o acúmulo de água no seu interior e a consequente formação intracelular de cristais de gelo (WATSON, 1995). O etilenoglicol, propilenoglicol, propanodiol, dimetilsufóxido, dimetilformamida, e glicerol são alguns exemplos desta classificação, sendo este último o mais comumente utilizado na criopreservação de sêmen em vários estudos (ESTESO et al., 2006; SA-ARDRIT et al., 2006; COLOMA et al. 2010).

O glicerol é quimicamente considerado um álcool, e sua adição ao meio de congelação de sêmen induz um aumento do volume de canais de solvente não congelados e uma menor concentração de sais nestes canais (MAZUR, 1977). O efeito do glicerol na membrana plasmática pode ocorrer por meio de uma ligação direta aos fosfolipídios da membrana, reduzindo sua fluidez e interferindo na permeabilidade seletiva da membrana celular à água e aos íons (PARKS e GRAHAM, 1992). Quando em altas concentrações, gera estresse osmótico, mudanças na organização, fluidez e permeabilidade da membrana, tornando-se tóxico aos espermatozoides (GRAHAM, 1996; WATSON, 1995). Assim, a concentração ideal dessa substância no diluente deve favorecer a predominância dos efeitos positivos sobre os negativos, e pode ser influenciada, principalmente, pelas características seminais de cada espécie (SILVA, 2005).

Quanto aos crioprotetores não penetrantes, estes são moléculas grandes, e não atravessam a membrana plasmática. Agem no meio extracelular como solutos ou colóides, promovendo o transporte de água para o exterior da célula (GRAHAM, 1996). Os agentes crioprotetores não penetrantes atuam por meio de efeito osmótico, facilitando a desidratação celular, pois tornam o meio diluente hipertônico. Com isso, a probabilidade de formação de cristais de gelo no interior das células, com consequente dano físico à membrana espermática, é reduzida (AMANN e PICKETT, 1987). A gema de ovo e leite desnatado, açúcares,

polímeros sintéticos, e amidas, são os exemplos mais comuns desse tipo de crioprotetores (GRAHAN, 1996).

A gema de ovo de galinha é usualmente o agente mais efetivo para a proteção dos espermatozoides contra os danos causados pelo frio, preservando a fertilidade após o armazenamento do sêmen na forma líquida ou congelada. A gema de ovo apresenta propriedade de modular e prevenir os efeitos da perda de fosfolipídios dos espermatozoides durante ou após a congelação (GONZALEZ, 2004). BOUCHARD et al. (1990) relacionou essa ação à presença da lipoproteína fosfatidilcolina que interage com a estrutura lipídica da membrana plasmática das células espermáticas e propicia a proteção. A gema de ovo previne também a liberação da enzima hialuronidase pela célula espermática (FOULKES, 1977).

Na presença da gema de ovo pode haver diminuição na concentração de glicerol, pois acredita-se que ela atua na superfície da membrana plasmática, e por possuir glicoproteínas de baixa densidade são responsáveis pela ação protetora das membranas (WATSON, 1995). Em diferentes espécies a adição ao diluente de gema de ovo pode variar de 15 % (HIWASA et al., 2009) a 20 % (SILVA et al., 2002; SA-ARDRIT et al., 2006; ESTESO et al., 2006; SILVA et al., 2013; SOARES et al., 2013) e a concentração de glicerol tem sido utilizada entre 3 % (SILVA et al., 2013) e 6 % (SILVA et al., 2002; ESTESO et al., 2006) com resultados satisfatórios para a qualidade espermática pós-descongelação.

1.2.4 Criopreservação do sêmen

O processo de criopreservação do sêmen é dividido em quatro etapas: resfriamento; congelação; armazenamento; e descongelação. A preservação das estruturas espermáticas após a congelação é obtida por uma interação entre diluidor, crioprotetor, curvas de resfriamento, congelação e descongelação, e também com as particularidades seminais de cada espécie (CASTELO et al., 2008). Durante o resfriamento e a congelação do sêmen, os espermatozoides sofrem uma série de mudanças físicas e químicas que incluem: a desidratação parcial, a penetração dos crioprotetores na célula, a reorganização estrutural dos lipídios e proteínas da membrana, a exposição às altas concentrações de solutos e aos cristais de gelo inter e intracelular (HENRY et al., 2002; SNOECK, 2003).

Na descongelação as células são expostas a esses mesmos fatores, mas de forma contrária: reidratação celular pela entrada de água na célula passando pela membrana

plasmática para balancear a osmolaridade quando os cristais extracelulares são derretidos. Os lipídios e proteínas da membrana plasmática são reorganizados e o crioprotetor é difundido para fora da célula (PICKETT, 1998).

A inconstância de temperatura existente nas etapas de refrigeração-congelação-descongelação causam danos ultraestruturais, bioquímicos e funcionais às células espermáticas de forma variável entre as espécies (SALAMON e MAXWELL, 2000). De acordo com HUANG et al. (1999), em sêmen de suínos, uma grande perda de espermatozoides viáveis ocorre durante as etapas de congelação e descongelação, mas relativamente, apenas pequenas mudanças ocorrem durante o resfriamento. Já em catetos (*P. tajacu*) houve uma redução da motilidade espermática após refrigeração a 5 °C (SILVA et al., 2013).

Durante a etapa de refrigeração ocorre o equilíbrio, que consiste na permanência do sêmen diluído a 4 °C ou 5 °C, até o início da etapa de congelação; e o período que o sêmen é exposto a tais temperaturas pode variar entre protocolos (PHILLIP, 2010). Alguns métodos foram desenvolvidos e testados, envolvendo refrigeração lenta e rápida do sêmen diluído, taxas de congelação e temperatura de descongelação (SILVA et al., 2013). Esses fatores em conjunto determinam a curva de congelação, que deve ser lenta o suficiente para evitar a formação de gelo intracelular e rápida o suficiente para evitar o choque osmótico (MAZUR, 1977).

A taxa de congelação lenta favorece a desidratação celular e o choque osmótico, como resposta à elevada concentração de sal do meio e a formação de gelo extracelular em temperaturas abaixo de zero. Por outro lado, a taxa de congelação rápida não permite que ocorra a desidratação da célula, favorecendo a formação de cristais de gelo intracelular (ANZAR et al., 2011). Em catetos (*P. tajacu*), por exemplo, foram obtidos resultados satisfatórios em sêmen submetido tanto à curva lenta quanto à rápida (CASTELO et al., 2010b; SILVA et al., 2013), entretanto SILVA et al. (2013) recomenda a utilização da curva rápida, por reduzir o tempo investido no procedimento.

Após a refrigeração, em diferentes espécies, a sequência mais comum das etapas da criopreservação seminal consiste na exposição das palhetas (contendo as amostras de sêmen) ao vapor de nitrogênio, seguindo-se o acondicionamento em botijões criobiológicos, onde as amostras são mergulhadas em nitrogênio líquido (N₂) a -196 °C, por tempo indeterminado (VILLAYERDE et al., 2009; CASTELO et al., 2010b; SILVA et al., 2011). Durante o processo, o tempo de exposição ao vapor de nitrogênio pode variar entre protocolos. Em

gatos domésticos (*Felis catus*), o protocolo de criopreservação utilizado por VILLAYERDE et al. (2009) expôs as palhetas contendo sêmen por 15 min ao vapor de nitrogênio, enquanto que CASTELO et al. (2010a) em trabalho com sêmen de catetos (*P. tajacu*), procederam a exposição por 20 min.

A criopreservação e seus protocolos já são bem explorados em mamíferos domésticos (GRAHAM et al., 1996; SILVA et al., 2000; PEÑA-MARTINEZ, 2004; CASTELO et al., 2008), e no tocante às espécies silvestres, estudos vem sendo realizados com o mesmo objetivo, havendo relatos em elefantes (*Elephas maximus*) (SA-ADRIT et al., 2006), felídeos (*Leopardus tigrinus*) (ERDMANN, 2005), cervídeos (*Cervus elaphus*) (ESTESO et al., 2006), catetos (*P. tajacu*) (CASTELO et al., 2010b), lobos (*Canis rufus*) (LOCKYEAR et al., 2009), macacos (*C. apella*) (OLIVEIRA et al., 2011), rinocerontes (*R. unicornis*) (STOOPS et al., 2010), mas não há informações sobre a utilização desse método em tatus, ou qualquer exemplar da superordem Xenartra.

Ainda, entre os protocolos de criopreservação de sêmen descritos nas espécies silvestres, o sêmen congelado em solução à base de tampão Tris em combinação com gema de ovo, na proporção de 20 % têm sido utilizado em gato-do-mato (*L. tigrinus*) (ERDMANN, 2005), elefantes (*E. maximus*) (SA-ARDRIT et al., 2006), catetos (*P. tajacu*) (CASTELO et al., 2010b), e macacos (*C. apella*) (OLIVEIRA et al., 2011), mostrando bons resultados tanto para a refrigeração, quanto para a congelação.

1.2.4.1 Crioinjúrias

O processo de criopreservação das células espermáticas resulta em diminuição da fertilidade quando comparada com sêmen fresco. Esse prejuízo surge da combinação de dois aspectos: perda da viabilidade espermática ou danos na capacidade funcional dos espermatozoides sobreviventes (WATSON, 2000). SA-ARDRIT et al. (2006) cita sobre a não ocorrência de gestação em elefantas inseminadas artificialmente com sêmen pós-descongelado que apresentavam valores aceitáveis de motilidade e viabilidade, e inferiu que alterações espermáticas promovidas pela criopreservação estão relacionadas com esse fato.

Alterações na motilidade e na estrutura dos espermatozoides ocorrem simultaneamente nas diferentes etapas de congelação e descongelação. Em ungulados, é bem conhecido que o resfriamento rápido do sêmen de 30 para 0 °C induz a um estresse letal para

algumas células. Esse estresse é proporcional à taxa de resfriamento, ao intervalo e ao limite de temperatura, sendo conhecido como “choque frio”, com efeito negativo variável entre as espécies (WATSON, 1995).

SA-ARDRIT et al. (2006) em estudo com sêmen criopreservado de elefantes (*E. maximus*) inferiu o estresse espermático como causador do decréscimo significativo dos parâmetros de motilidade, integridade da membrana plasmática e acrossomal, e atividade mitocondrial dos espermatozoides pós-descongelados em relação ao sêmen fresco.

Os danos celulares pela congelação-descongelação, muitas vezes são considerados irreversíveis (GONZALEZ, 2004). Segundo HAMMERSTEDT et al. (1990), estes podem ocorrer em cada um dos passos do processo de criopreservação, no entanto, eles serão detectados somente depois que a célula já passou por todos os tratamentos, sendo mais difícil, se não impossível, fazer uma análise detalhada dos espermatozoides quando estes estão em baixas temperaturas ou em estado semissólido. É sempre necessário completar todo o procedimento e analisar as células em suspensão, e então atentar para designar o ponto de alteração deletéria da célula, avaliando as probabilidades de danos em todos os compartimentos celulares.

1.2.4.1.1 Danos às membranas plasmáticas e acrossomais

A integridade estrutural e funcional da membrana plasmática e do acrossoma são reconhecidamente pontos críticos para a capacidade de fertilização dos espermatozoides. Na etapa de refrigeração, a membrana celular dos espermatozoides sofre algumas mudanças relacionadas à sua estrutura, principalmente aos lipídios e, alterações funcionais que ainda não foram completamente entendidas e são parcialmente irreversíveis. Espermatozoides sensíveis às quedas de temperatura podem apresentar ruptura da camada lipídica da membrana, resultando em perdas irreversíveis da motilidade (BUHR et al., 1994).

Ainda, os elementos da membrana, como as proteínas integrais, são agrupados pela separação da fase lipídica, e as funções dessas proteínas, como por exemplo, os canais iônicos (Ca^{++}), terminam sendo afetadas, devido ao fato da permeabilidade da membrana aumentar após o resfriamento (ROBERTSON e WATSON, 1986). As consequências desse efeito sobre a regulação do cálcio refletem em sérios efeitos sobre a função espermática, como

implicações na capacitação e na fusão entre a membrana plasmática e a porção externa da membrana do acrossomo (CRITSER et al., 1998).

HAY et al. (1997) denomina como choque do frio o conjunto de alterações provocadas pela congelação/descongelação. Esse evento afeta todas as membranas espermáticas, inclusive a acrossomal, interferindo na morfologia dessa estrutura (WATSON, 1995). Em elefantes, SA-ARDRIT et al. (2006) verificaram por imagens de ultraestrutura vários tipos de danos ao acrossoma de espermatozoides pós-descongelados, entre eles: acrossoma edemaciado, ruptura da membrana, vazamento do conteúdo acrossomal, e perda completa da estrutura.

A criopreservação está associada com a indução de alterações na membrana espermática em humanos (DURU et al., 2001), touros (JANUSKAUSKAS et al., 2003) e equinos (ALVARENGA et al., 2000). Em koalas (ZEE et al., 2007), a criopreservação seminal resultou em perda da integridade da membrana plasmática; e em elefantes (*E. maximus*), as organelas mais frequentemente danificadas foram as membranas espermáticas (plasmática, acrossomal e mitocondrial), todas identificadas por ultramicroscopia (SA-ARDRIT et al., 2006).

1.2.4.1.2 Danos mitocondriais

Em suínos, COUNTERS et al. (1989) observaram mudanças na arquitetura mitocondrial em espermatozoides submetidos à baixa temperatura (5 °C), e após a criopreservação. Alterações nas mitocôndrias como: mudanças na sua estrutura ou alterações na forma, condensação e perda de material mitocondrial foram descritas em outras espécies (JONES e MARTIN, 1973; SA-ARDRIT et al., 2006; SILVA et al., 2009). Após o choque frio, QUINN et al. (1969) reportaram alterações mitocondriais em espermatozoides de ovinos, caracterizadas pela aparência mais clara da organela através de ultramicroscopia e perda de proteínas, confirmadas por análise histoquímica.

WATSON (1995) relatou sobre a ocorrência de perdas de conteúdo estrutural e formação de grandes cristais de gelo nas mitocôndrias de espermatozoides submetidos à congelação, afetando provavelmente a produção de adenosina trifosfato (ATP), devido a alterações na fosforilação oxidativa e no transporte de prótons realizados na crista mitocondrial interna. Ainda, a criopreservação ativa o processo de apoptose mitocondrial,

caracterizado pela indução da abertura dos poros mitocondriais e posterior liberação os fatores pró-apoptóticos dessa organela, resultando na diminuição do potencial de membrana (RAVAGNAN et al., 2002). Finalmente, esses fatores são subsequentemente ativados, desencadeando alterações tanto na superfície celular quanto no núcleo (MARTIN et al., 2004).

1.2.4.1.3 Danos ao citoesqueleto

As membranas celulares ancoram-se no citoesqueleto, desta forma, qualquer alteração nessa estrutura, de alguma maneira, repercute negativamente na função celular. Estudos identificando a despolarização prematura dos filamentos de actina em embriões bovinos submetidos ao resfriamento (SAUNDERS e PARKS, 1999) podem trazer importantes implicações na criopreservação dos espermatozoides, por mostrarem que muitas dessas proteínas estruturais apresentam despolimerização e repolimerização de acordo com a temperatura a que são submetidas (WATSON, 1995).

SPUGIN et al. (1995) propuseram que a despolimerização da F-actina do citoesqueleto, é um passo necessário para permitir à aproximação do plasmalema à membrana externa do acrossoma durante a exocitose; portanto, a despolimerização e repolimerização, de acordo com a temperatura do resfriamento e criopreservação, poderiam contribuir com uma fusão desorganizada.

Por sua vez, efeitos, como o declínio da motilidade, observados após congelação e descongelação da célula espermática podem ser explicados, em parte, pelas mudanças no transporte ativo e permeabilidade da membrana plasmática na região da cauda, como também à interferências na disponibilidade de energia ou danos nos elementos do axonema (WATSON, 1995).

1.2.4.1.4 Danos nucleares

A criopreservação de espermatozoides pode induzir danos nucleares, associados à ocorrência de descondensação da cromatina, desnaturação do DNA, e indução da vacuolização nuclear (FORTUNATO et al., 2012). O grau de desnaturação do DNA durante a

criopreservação pode ser influenciado pelo diluente, tendo efeito negativo na subsequente fertilidade (KARABINUS et al., 1991)

Em sêmen criopreservado de humanos, a cromatina não condensada foi fortemente correlacionada com a redução da taxa de viabilidade dos espermatozoides (BOITRELLE et al., 2012). A causa para esse fato pode estar relacionada ao aumento significativo de espécies reativas de oxigênio (EROs), que promovem danos à cromatina de espermatozoides submetidos a um longo período de armazenamento em nitrogênio líquido (ALVAREZ e STOREY, 1992; BALL et al., 2002; PONS-REJRAJI et al., 2009).

Nesse aspecto, existe ainda, um grande número de registros mostrando que altas concentrações de EROs induzem graves danos ao DNA (BENNETT e AITKEN, 2005; SILVA e GADELLA, 2006), e estão associadas com infertilidade masculina (PADRON et al., 1997). Sugere-se ainda, que a criopreservação seminal desencadeia a via apoptótica das células espermáticas, com consequente deterioração do DNA através de clivagem por endonucleases específicas (PAASCH et al., 2004).

1.2.5 Avaliação do sêmen

1.2.5.1 Análise clássica

Para medir a fertilidade de um ejaculado a análise isolada de um parâmetro não é capaz de atingir esse objetivo (ARRUDA et al., 2003), sendo necessário avaliar vários aspectos do sêmen em uma análise multifatorial, para determinar uma maior ou menor fertilidade potencial do macho (SIQUEIRA et al., 2007). De acordo com MIES FILHO (1982), duas classes de caracteres devem ser levadas em consideração na avaliação seminal: os caracteres físico-químicos (macroscópicos) e os microscópicos. Os primeiros devem ser avaliados imediatamente após a coleta do sêmen, e a avaliação desses caracteres determinam o volume, cor, aspecto, odor e pH do ejaculado.

Através da análise dos caracteres microscópicos podem ser mensurados parâmetros para concentração, motilidade, vigor, proporção de espermatozoides com integridade de membrana plasmática e morfologia espermática (CBRA, 1998).

1.2.5.1.1 Motilidade e vigor

A motilidade espermática é uma estimativa subjetiva e quantitativa, de grande importância na avaliação seminal. Este exame avalia o percentual de células que apresentam algum movimento, em uma determinada amostra de sêmen. Já o vigor, normalmente avaliado em conjunto com a motilidade, é também uma análise subjetiva, entretanto, para avaliação desse parâmetro, são atribuídos escores que compreendem uma faixa de 0 a 5 para qualificar o movimento expresso pelos espermatozoides, sendo 1 para o ejaculado que apresenta espermatozoides com movimentação fraca e 5 para ejaculados que apresentando espermatozoides com forte movimentação através do campo do microscópico (JOHNSTON et al., 2001; ZAMBELLI e CUNTO, 2006).

Apesar dos resultados dos parâmetros de motilidade e vigor serem informações importantes para identificar a capacidade fertilizante da célula espermática (PEÑA-MARTINEZ, 2004), estes não devem ser os únicos aplicados para predizer sobre a viabilidade seminal, pois espermatozoides imóveis não estão necessariamente mortos (JANUKAUSKAS e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 1995) e, ainda, em cães foi observado que espermatozoides com boa motilidade podem ser incapazes de fertilizar um oócito caso apresentem danos acrossomais (STROM et al., 1997). AMORIM et al. (2012) observaram em ejaculados de tatu-peba (*E. sexcinctus*), nas amostras de sêmen diluídas em ACP®-300 e analisadas após 3h sob temperatura de 5 °C onde foi demonstrada a existência de uma proporção de espermatozoides vivos ($22,6 \pm 5,8 \%$), mesmo que imóveis (motilidade igual a 0).

1.2.5.1.2 Integridade estrutural e funcional da membrana espermática

A viabilidade espermática está relacionada com a integridade da membrana plasmática que pode ser avaliada por meio da utilização de esfregaços corados com substâncias que possuem ação dependente da capacidade da membrana celular ser permeável ou não à penetração dos mesmos no compartimento nuclear do espermatozoide (OLIVEIRA et al., 2009). Um exemplo desse princípio pode ser dado através do uso da eosina-nigrosina, um corante supravital, que penetra em espermatozoides possuidores de membrana lesionada, e ao penetrar na célula promove uma coloração rosa ao núcleo (TARTAGLIONE e RITTA, 2004).

Além da eosina-nigrosina, outro corante bastante utilizado com a mesma finalidade é o azul de bromofenol, comumente utilizado em avaliação de sêmen de mamíferos silvestres como o tatu-peba (*E. sexcinctus*) em metodologia para descrição das características seminais de amostras colhidas por eletroejaculação (SERAFIM et al., 2010), e em diferentes metodologias para avaliação do sêmen criopreservado de catetos (*P. tajacu*) (CASTELO et al., 2010b; SILVA et al., 2013).

De outro modo, a integridade da membrana espermática também pode ser avaliada observando a sua resposta funcional em espermatozoides colocados em solução hiposmótica; esse método é denominado de teste hiposmótico (HOST) (SPITTALER e TYLER, 1985). O percentual de células apresentando membrana funcional é obtido através da contagem de espermatozoides apresentando caudas enroladas ou encurvadas, devido à passagem de água através da membrana para o interior da célula como processo de restabelecimento do equilíbrio osmótico (DREVIUS e ERIKSSON, 1966).

Segundo JEYENDRAN et al. (1984), a solução hiposmótica ideal para utilização em HOST deve exercer uma pressão osmótica grande o suficiente para provocar um aumento observável no volume celular, mas pequeno suficiente para prevenir a lise da membrana plasmática. A decisão sobre osmolaridade das soluções utilizadas para o HOST depende da espécie em estudo. SANTOS et al. (2011) compararam soluções aquosas à base de frutose com diferentes osmolaridades (0, 50, 100 e 150 mOsm/L) para analisar a integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides de tatu-peba (*E. sexcinctus*), sendo recomendado o uso da solução com 50 mOsm/L para conduzir o HOST nessa espécie, devido a elevada proporção de espermatozoides reativos (59 %).

1.2.5.1.3 Análise morfológica

Outro parâmetro indispensável durante a avaliação seminal é a morfologia espermática, já que em estudos com espécies domésticas foi intrinsecamente relacionada a problemas de fertilidade (OETTLÉ, 1993).

Durante a avaliação morfológica, as alterações são analisadas percorrendo todas as regiões do espermatozoide. Os defeitos podem ocorrer em um, ou simultaneamente em diferentes dos segmentos da célula espermática. De acordo com NOAKES et al. (2001), os

defeitos espermáticos podem ser classificados e agrupados segundo a sua localização nas diferentes regiões do espermatozoide como: defeitos de cabeça e defeitos de cauda.

Entretanto, a classificação mais utilizada é baseada na origem em que esses defeitos ocorrem no decorrer do trato reprodutor masculino (BLOOM, 1950). Assim, por essa classificação, os defeitos são divididos em anormalidades primárias consideradas de origem intra-gonadal e ocorridas durante falhas no processo de espermatogênese, portanto indicativas de processos patológicos; anormalidades secundárias que são as alterações de origem extra-gonadal, geradas durante a maturação no epidídimo, ou seja, após a formação dos espermatozoides; e, anormalidades terciárias, quando ocorrem após a ejaculação.

Vários métodos têm sido desenvolvidos para avaliar a morfologia da célula espermática. Esfregaços úmidos de sêmen podem ser examinados por microscopia de contraste de fase após a fixação com glutaraldeído ou tampão salina formolizada para manter as características celulares e permitir uma observação futura (CBRA, 1998). A morfologia também pode ser avaliada após o uso de corantes Wright, Rosa de Bengala, Diff-Quik, Spermac[®] (OETTLÉ e SOLEY, 1985; PURSWELL et al., 1992; STRÖM et al., 1997), Giemsa (CARDOSO et al., 2003), Hematoxilina-eosina (SILVA et al., 2003) e eosina-nigrosina (SOUSA et al., 2013). Este último foi utilizado para descrição morfológica de espermatozoides de tatu-peba (*E. sexcinctus*) (SOUSA et al., 2013), porém esse corante não favoreceu a observação detalhada das estruturas espermáticas ao microscópio de luz (aumento de 1000×), sendo mais apropriado o uso do corante Rosa de Bengala para esse fim (SOUSA, 2010).

1.2.5.2 Análises complementares

1.2.5.2.1 Teste de termorresistência (TTR)

A avaliação da longevidade dos espermatozoides *in vitro* pode ser realizada através do teste de exaustão desses gametas sob várias temperaturas, a fim de avaliar a capacidade de sobrevivência espermática, e manter a fertilidade por intervalos prolongados, em temperatura fixa (BAG et al., 2004). A esse procedimento denomina-se teste de termoresistência (TTR), durante o qual são testados, principalmente, os parâmetros de motilidade e viabilidade dos

espermatozoides. DIMITROPOULOS (1967) propôs este teste para avaliar a fertilidade potencial de sêmen congelado de bovino, que posteriormente foi adaptado às demais espécies domésticas como o suíno, utilizando sêmen descongelado (SCHULZE et al., 2013), e silvestres, como o tatu-peba (*E. sexcinctus*) (SANTOS et al., 2011), onde foram avaliadas amostras de sêmen fresco diluído em Tris.

Convencionalmente, realiza-se o TTR incubando-se as amostras de sêmen a 37 °C (VIANNA et al., 2009). No entanto, por ter sido previamente descrito como uma tentativa de simular o trânsito dos espermatozoides no trato genital feminino (DIMITROPOULOS, 1967), inferiu-se que a temperatura empregada durante o teste de termorresistência deve ser adequada à temperatura corpórea da espécie, no caso dos tatus-peba, a temperatura de incubação na qual as amostras de sêmen foram submetidas foi de 34 °C (SANTOS et al., 2011), enquanto que em ensaio com búfalos (*B. bubalis*) (KOONJAENAK et al., 2007) e suínos (SCHULZE et al., 2013) a temperatura de escolha foi 38 °C. Outro critério que deve ser levado em consideração é o intervalo de tempo de incubação em que as células espermáticas devem permanecer, e este pode variar de acordo com o protocolo escolhido por cada pesquisador (KOONJAENAK et al., 2007; VIANNA et al., 2009; SANTOS et al., 2011; SCHULZE et al., 2013).

Além de predizer a fertilidade de machos em várias espécies, o TTR também pode ser empregado no intuito de discriminar diluentes de conservação do sêmen, conforme foi testado em ovinos (MAMPOUYA, 1973). Em tatus, esse teste foi aplicado para predizer a sobrevivência das células espermáticas a partir de sêmen diluído em Tris em amostras incubadas sob temperatura de 34 °C (SANTOS et al., 2011), determinado a presença de motilidade até 345 min de avaliação e presença de células vivas até os 360 min.

1.2.5.2.2 *Análise ultraestrutural*

O microscópio eletrônico foi inventado em 1931 por Ernest Ruska (1902-1988) e Max Knoll (1897-1969) e é classificado como um aparelho tecnológico com potencial de aumento muito superior ao microscópio de luz (KNOLL e RUSKA, 1932). De acordo com KNOLL e RUSKA (1932), a microscopia eletrônica é uma técnica de inovação importante para determinar o tamanho e a forma de estruturas inorgânicas e biológicas, baseada de interação de elétrons que incidem sobre o substrato a ser analisado, com comprimento de onda

que varia entre 0,1 e 1,0 nm. O material a ser estudado neste tipo de microscópio deve passar por um complexo processo de desidratação, fixação e inclusão em resinas especiais, com grau de rigidez suficiente para permitir a realização de cortes ultrafinos obtidos através de um ultramicrotomo (MANNHEIMER, 2002).

Existem 2 tipos de microscópio eletrônico básico utilizados para a avaliação de sistemas biológicos: o de transmissão (MET), usado para a observação de cortes ultrafinos, e o de varredura (MEV), capaz de produzir imagens de alta ampliação para observação de superfícies (MANNHEIMER, 2002).

A maior parte dos estudos em microscopia eletrônica de transmissão relacionada à análise de sêmen em diversas espécies animais é baseada, principalmente, na descrição e demonstração ultraestrutural de cortes ultrafinos que seccionam ao acaso a cabeça, a peça intermediária e a cauda (peça principal e peça terminal) dos espermatozoides, sendo possível observar as organelas celulares e membranas (BRITO et al., 2010, SOUSA et al., 2013).

A eletromicroscopia de transmissão é bastante utilizada como metodologia complementar nos estudos relacionados às características reprodutivas em diferentes mamíferos e, dentre os silvestres, fez parte da metodologia do primeiro trabalho sobre a descrição da célula espermática de tatu-de-cauda-pelada (*C. unicinctus*) (HEATH et al., 1987). Esse método também foi aplicado em amostras de sêmen fresco de ursos pretos americanos (*Ursus americanus*) (BRITO et al., 2010) e quatis (*Nassua nassua*) (LIMA et al., 2009) para descrever a célula espermática; e em trabalhos com botos (*Phocaenoides asiaeorientalis neophocaena*) para descrição das características biológicas do sêmen e ultraestrutura dos espermatozoides (LI et al., 2009).

Entretanto, estudos utilizando esse tipo de equipamento ainda são limitados quando comparados às demais técnicas de avaliação espermática, em consequência dos custos operacionais. Porém, pode-se afirmar que, embora a MET seja de difícil acesso, esta técnica é de extrema importância, uma vez que os testes utilizados rotineiramente não permitem avaliar as alterações que ocorrem em porções subcelulares ou em escala manométrica (SARAIVA et al., 2009).

A microscopia eletrônica também tem sido útil no enfoque de criojúrias ocorridas em diferentes regiões espermáticas, mostrando imagens da fragmentação do DNA e a condensação da cromatina, lobulação da membrana acrossomal, e distensão mitocondrial (BACCETTI et al., 1996; BLANC-LAYRAC et al., 2000). Sobre isso, SILVA et al. (2009) estudaram a interferência da criopreservação sobre as células espermáticas de cães e a MET foi utilizada

como um teste descritivo e qualitativo, que possibilitou identificar lesões da membrana plasmática e acrossomal de espermatozoides, as quais eram de difícil visibilidade em microscopia óptica. Em espécies silvestres, trabalho semelhante foi desenvolvido em células espermática pós-descongeladas de elefante asiático (*E. maximus*) (SA-ADRIT et al., 2006) e em espermatozoides epididimários criopreservados da espécie *Tupaia belangeri chinensis*, um pequeno roedor arbícola (ZHANG et al., 2011).

Os trabalhos utilizando a MET para analisar ou descrever as células espermáticas do sêmen criopreservado, são ainda muito escassos quando direcionados às espécies silvestres, e, neste aspecto, inexistente em qualquer exemplar Xenartra até o presente momento. Assim a aplicação da MET para avaliar espermatozoides criopreservados de tatu-peba (*E. sexcinctus*) se faz pioneira dentro desta superordem.

1.2.5.2.3 Avaliação espermática por fluorescência

A fluorescência é um fenômeno óptico no qual a luz ultravioleta (UV) é absorvida por uma substância chamada fluoróforo ou fluorocromo que torna-se excitada, emitindo comprimento de onda maior que o absorvido (VALEUR, 2002).

O desenvolvimento de técnicas de coloração celular utilizando a fluorescência como marcadores de DNA, tem sido uma ferramenta para avaliação da funcionalidade dos espermatozoides, com alta aplicabilidade após a prática de congelamento-descongelamento em sêmen de várias espécies domésticas como os bovinos (RODRIGUÉZ-MARTINEZ et al., 1997) e silvestres onde há registros da aplicação desse método para avaliar a integridade de membrana de espermatozoides descongelados de rinocerontes, aplicando Hoechst 33258 diluído em tampão citrato (*R. unicornis* - STOOPS et al., 2010); e o uso de SYBR®-14 associado a IP em espermatozoides criopreservados de elefantes (*E. maximus* – SA-ADRIT et al., 2006).

As moléculas fluorescentes utilizadas para o monitoramento da funcionalidade e/ou a integridade das estruturas espermáticas, possuem capacidade de se ligar a pontos específicos das células, permitindo diagnóstico prático e direto da função de estruturas espermáticas como a membrana plasmática e mitocôndrias (CELEGHINI et al., 2010). De acordo com a estrutura celular que se deseja analisar, existem diversas soluções fluorescentes que são comumente aplicadas na avaliação seminal de diferentes espécies.

1.2.5.2.3.1 Membrana plasmática

A membrana plasmática é uma estrutura semipermeável que envolve toda a célula espermática e organelas, mantendo o gradiente químico de íons e outros componentes solúveis, através do transporte de substratos energéticos (glicose e frutose) do ambiente extracelular para o interior do espermatozoide (BURANT et al., 1994; SCHURMMAN et al., 2002). Se a membrana espermática não está funcionalmente intacta o espermatozoide é considerado inviável (morto), não sendo capaz de fertilizar quando *in vitro* (SCHULZE et al., 2013).

Para avaliação da integridade da membrana plasmática, moléculas membrana-impermeáveis com afinidade por DNA são utilizadas, e se a célula conseguir expulsá-las, pode ser considerada viva (Figura 7). Baseado nesse princípio SILVA e GADELLA (2006), em revisão, listaram diferentes fluoróforos testados em células espermáticas de mamíferos, cada um deles com distintas propriedades de excitação (ex) e emissão (em): Hoechst 33258 (ex/em de 365 e 460 nm comprimento de onda), Yo-Pro I (ex/em de 488 e 530 nm λ), Etídio Homodimérico-1 (ex/em 522/35 e 598/40 nm λ) e Iodeto de Propídio (IP) (ex/em de 488 e 568/ > 620 nm λ). Este último é utilizado de modo convencional, fluorecendo em vermelho o núcleo de células com membrana plasmática lesionada (ARRUDA et al., 2003), sendo comum o seu uso em associação com outros fluoróforos nos protocolos que visam identificar células vivas e células lesionadas, simultaneamente. Como exemplos dessa aplicabilidade, há descrições em muare, onde se utilizou a associação de IP e o Diacetato de fluoresceína (CFDA) para avaliar a integridade da membrana espermática de espermatozoides epididimários criopreservados (VIEIRA et al., 2013), em suínos, o IP foi associado a Rodamina 123 em experimento para verificar a capacidade de fertilização *in vitro* do ejaculado (SHULZE et al., 2013). Em espécies silvestres, o uso do IP associado ao SYBR[®]-14 foi descrito em protocolo para análise da viabilidade em espermatozoides criopreservados de elefantes (*E. maximus*) (SA-ARDRIT et al., 2006).

Muitas dessas substâncias fluorescentes associadas ao IP marcam espermatozoides com membrana plasmática íntegra devido à qualidade anfipática dessas sondas, devido à presença do grupamento acil em seus compostos. As sondas anfipáticas são capazes de atravessar a membrana intacta e penetrar nas células vivas. Nesse momento, estas sondas são imediatamente desaciladas por esterases, que as deixam impermeáveis à membrana, permanecendo no interior da célula (Figura 7). Um exemplo clássico desse tipo de fluoróforo

é o diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) (fluorescência verde – ex/em de 580 a 630 e 485 a 520 nm λ) que por ser permeável à membrana plasmática intacta, atua como marcador de membrana íntegra (DONOGHUE et al., 1995). Com atuação semelhante, o Hoechst 3342 é também um corante membrana-permeável, e contrasta o núcleo emitindo fluorescência azul quando ligado ao DNA (CELEGHINI et al., 2010). Foi possível avaliar a integridade de membrana de espermatozoides descongelados de rinocerontes, aplicando Hoechst 33258 diluído em tampão citrato (*R. unicornis* - STOOPS et al., 2010).

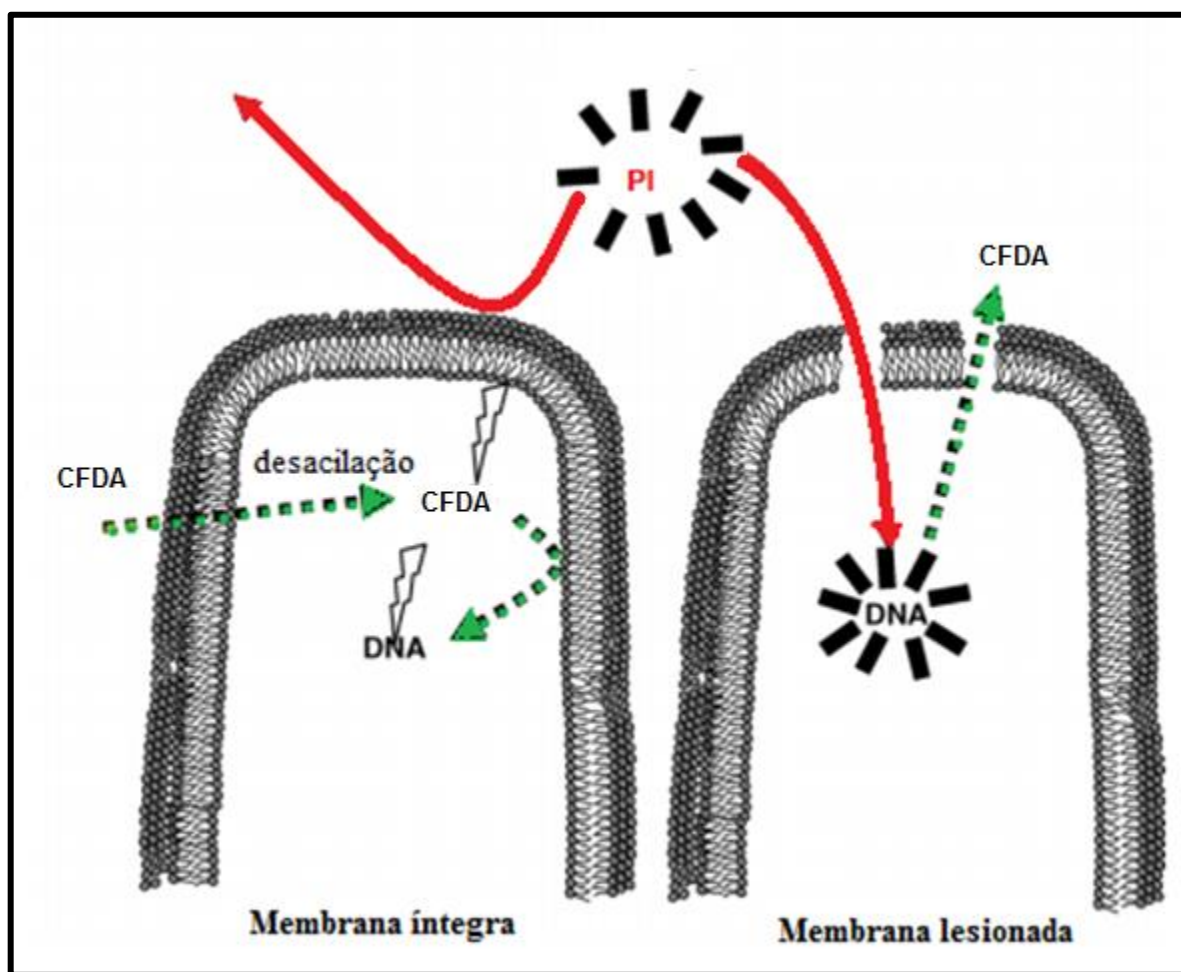


Figura 7 – Diferentes mecanismos de ação dos fluoróforos com afinidade ao DNA utilizados para determinar a integridade estrutural da membrana plasmática. A seta verde (pontilhada) indica o comportamento do fluoróforo carboxifluoresceína (CFDA) utilizado para marcar espermatozoides com membrana plasmática intacta, mostrando também a ocorrência da desacilação, modificando a configuração da molécula do corante, impedindo que esta atravesse a membrana de volta ao meio extracelular. A seta vermelha (contínua) mostra o iodeto de propídio, indicador de membrana plasmática lesionada, impedido de chegar até o DNA através da membrana plasmática intacta, sendo isso possível apenas se esta apresentar alguma descontinuidade.

Fonte: Adaptado de SILVA e GADELLA, (2006).

1.2.5.2.3.2 Atividade mitocondrial

As mitocôndrias podem ser marcadas com corantes específicos para essas organelas (GRAVANCE et al., 2001). Originalmente a Rodamina 123 foi utilizada seletivamente para marcar mitocôndrias funcionais. O princípio desse teste, é que a fluorescência vermelha ocorre apenas quando o gradiente de prótons sobre a membrana mitocondrial interna é formado (Rodamina 123 é um corante de membrana potenciométrico) (SILVA e GADELLA, 2006).

Este gradiente de prótons é resultado de uma ativa corrente transportadora de elétrons e é acoplado a fosforilação oxidativa: os prótons que fluem de volta através da ATPsintase para a matriz mitocondrial estão impulsionando a produção de ATP aeróbico. As mitocôndrias não coradas indicam que o gradiente de prótons entrou em colapso e, consequentemente, a produção de ATP aeróbico cessou. Assim, espermatozoides não marcados não possuem mitocôndrias funcionais (GARNER et al., 1997). Interessante é que a peça intermediária ou está totalmente marcada ou não, indicando que a despolarização da membrana mitocondrial interna é sincronizada, ocorrendo de uma vez em toda a peça intermediária (MUKAI et al., 2004).

Recentemente foi desenvolvido o cloreto de 8-(4-clorometil) fenil-2,3,5,6,11,12,14,15 octahidro-1H,4H,10H,13H-diquinolizino-8H-xantílio (CMXRos – Mito Tracker red[®] – 568/595 ex/em nm de comprimento de onda, respectivamente), um fluorescente intrínseco, para avaliar a atividade mitocondrial, possuindo alta afinidade por mitocôndrias funcionais (CELEGHINI et al., 2010) (Figura 8). O uso desse marcador foi empregado na identificação de espermatozoides contendo mitocôndrias ativas em sêmen pós-descongelado de elefantes (*E. maximus* – SA-ARDRIT et al., 2006); compôs um dos protocolos testados para avaliar a integridade das membranas espermáticas em testes com sêmen bovino, associado com outros marcadores: FITC-PSA, Hoechst 3342 e IP (CELEGHINI, 2005), e ainda seu uso foi descrito na avaliação da atividade mitocondrial de espermatozoides epididimários criopreservados de muare (VIEIRA et al., 2013).

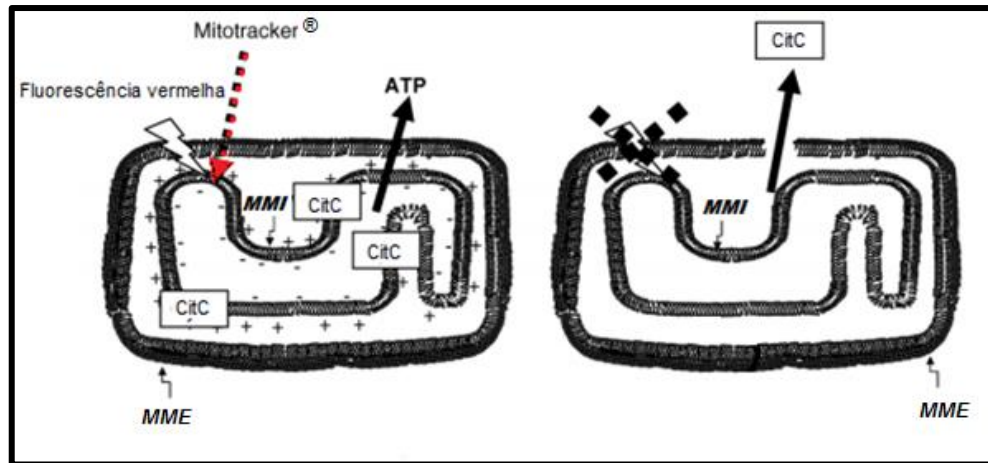


Figura 8 – Esquema do mecanismo de ação do fluoróforo Mito Tracker red®, mostrando sua afinidade à membrana mitocondrial interna (*MMI*) ativa (seta pontilhada vermelha), caracterizada pela produção de adenosina trifosfato (ATP) e presença da proteína citocromo C (CitC).

Fonte: Adaptado de SILVA e GADELLA , 2006.

1.2.6 Justificativa

A superordem Xenarthra representa um pequeno grupo de mamíferos, onde alguns integrantes estão vulneráveis ou em perigo de extinção, e entre eles, espécies de tatus como o tatu-bola (*Tolypeutes* sp.) e o tatu canastra (*P.maximus*). Mesmo diante do aumento do interesse em pesquisas voltadas para a conservação das espécies silvestres, os estudos direcionados aos xenartras ainda são pouco explorados.

Assim, dada a importância da criopreservação seminal para a conservação das espécies, tornam-se válidos os testes sobre essa biotécnica reprodutiva em indivíduos como o tatu-peba, devido ao fato de ser uma espécie classificada com baixo risco de extinção e também pela disponibilidade de exemplares em cativeiro, não havendo a necessidade de retirada de indivíduos selvagens de seu habitat para uso experimental.

Considerando a escassez, em qualquer exemplar Xenartra, de referências que utilizem a criopreservação, é relevante adequar para os tatus-peba protocolos de criopreservação já estabelecidos em animais domésticos, ou em outras espécies silvestres, cuja adaptação dependerá de medidas que correspondam à avaliação criteriosa do material seminal, identificação e correção dos pontos críticos ou limitantes da técnica na espécie, a ponto de no futuro serem utilizados de forma eficiente nos programas de conservação de indivíduos do mesmo táxon que se encontram em condições de perigo.

1.2.7 Hipóteses científicas

I – As soluções-base Tris e ACP[®] são apropriadas como diluidores seminais para os tatus-peba (*E. sexcinctus*);

II – A centrifugação interfere nos resultados para os parâmetros seminais dos espermatozoides de tatus-peba (*E. sexcinctus*), principalmente sobre motilidade, vigor e morfologia;

III – É possível recuperar espermatozoides viáveis após a criopreservação do sêmen de tatus-peba (*E. sexcinctus*).

1.2.8 Objetivos

1.2.8.1 Geral

Estabelecer um protocolo eficiente para a diluição e criopreservação do sêmen de tatu-peba (*E. sexcinctus*).

1.2.8.2 Específicos

- a)** Comparar o efeito de diferentes diluidores (Tris-gema e ACP[®]) sobre os parâmetros de qualidade geral do sêmen de tatu-peba (*E. sexcinctus*);
- b)** Utilizar a centrifugação para remover o plasma seminal, e verificar seus efeitos sobre os parâmetros de qualidade geral do sêmen de tatu-peba (*E. sexcinctus*);
- c)** Utilizar a associação de sondas fluorescentes para avaliar a integridade de membrana plasmática e atividade mitocondrial em células espermáticas de tatu-peba (*E. sexcinctus*);
- d)** Descrever as características ultraestruturais de espermatozoides provenientes de sêmen descongelado de tatu-peba (*E. sexcinctus*), com enfoque nos danos induzidos pela criopreservação em diferentes regiões espermáticas.

1.2.9 Referências

AITKEN, R.J.; CLARKSON, J.S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining of the efficiency of sperm preparation technique. **J. Androl.**, v. 9, p. 367-376, 1988.

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 89, n. 1-4, p. 105-113, 2005.

ALVARENGA, M.A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MOREIRA, R.M.; CESARINO, M.M. Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. **Equine Vet. J.**, v. 32, n. 6, p. 541-5, 2000.

ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. **J. Androl.**, v. 13, n. 3, p. 232-41, 1992.

ALVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; ALVAREZ, M.; BORRAGAN, S.; MARTINEZ PASTOR, F.; HOLT, W.V.; FAZELI, A.; DE PAZ, P.; ANEL, L. The addition of heat shock protein HSPA8 to cryoprotective media improves the survival of brown bear (*Ursus arctos*) spermatozoa during chilling and after cryopreservation. **Theriogenology**, v. 79, n. 3, p. 541-50, 2013.

ALVES, H.M.; OLIVEIRA, I.R.; CASTELO, T.S.; LIMA, G.L.; SOUZA, A.L.; MOREIRA, M.A.; DE PAULA, V.V.; SILVA, A.R. Comparison of different glycerol and egg yolk concentrations added to tris-based extender for the collared peccaries (*Tayassu tajacu*) semen freezing. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 48, n. 3, p. 506-11, 2013.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **J. Equine Vet. Sci.**, v. 7, p. 145-173, 1987.

AMORIM, R.N.L.; EMERENCIANO, K.D.M.; SOUSA, P.C.; CASTELO, T.S.; LIMA, G.L.; SILVA, A.R. Short-term preservation at 5 °C of armadillo's (*Euphractus sexcinctus*) semen.

In: III INTERNATIONAL SYMPOSIUM ANIMAL BIOLOGY OF REPRODUCTION, ISABR, 2012, Campinas, SP. **Anais...** Campinas: ISABR, 2012. p. 971.

AMORIM, R.N.L.; SOUSA, P.C.; CASTELO, T.S.; SANTOS, E.A.A.; SILVA, A.R. Características do sêmen de tatus-peba (*Euphractus sexcinctus* Linnaeus, 1758) coletados por eletroejaculação utilizando diferentes protocolos anestésicos. In: XVII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFERSA, 2011, Mossoró, RN. **Anais...** Mossoró: UFERSA, 2011. p. 47.

ANACLETO, T.C.S.; DINIZ-FILHO, J.A.F.; VITAL, M.V.C. Estimating potential geographic ranges of armadillos (Xenarthra, Dasypodidae) in Brazil under niche-based models. **Mammalia**, v. 70, p. 202-213, 2006.

ANDRABI, S.M.H.; MAXWELL, W.M.C. A review of reproductive biotechnologies for conservation of endangered species. **Ani. Reprod. Sci.**, v.99, n. 3-4, p. 223-243, 2007.

ANEL, L.; GOMES-ALVES, S.; ALVAREZ, M.; BORRAGAN, S.; ANEL, E.; NICOLAS, M.; MARTINEZ-PASTOR, F.; DE PAZ, P. Effect of basic factors of extender composition on post-thawing quality of brown bear electroejaculated spermatozoa. **Theriogenology**, v. 74, n. 4, p. 643-51, 2010.

ANZAR, M.; KROETSCH, T.; BOSWALL, L. Cryopreservation of bull semen shipped overnight and its effect on post-thaw sperm motility, plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and normal acrosomes. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 126, p. 23-31, 2011.

ARRUDA, R.P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. 121f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2000.

ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; GARCIA, A.R.; LIU, I.K.M. Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. **Theriogenology**, v. 58, p. 253-256, 2002.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. **Acta Sci. Vet.**, v. 31, p. 230-231, 2003.

BACCETTI, B.; COLLODEL, G.; PIOMBONI, P. Apoptosis in human ejaculated sperm cells (Notulae seminologicae). **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v. 28, p. 587-596, 1996.

BAG, S.; JOSHI, A.; NAQVI, S.M.K.; MITTAL, J.P. Effect of post-thaw incubation on sperm kinematics and acrosomal integrity of ram spermatozoa cryopreserved in medium-sized French straws. **Theriogenology**, v. 62, p. 415-424, 2004.

BALL, B.A.; BAUBER, J.; SABEUR, K.; Role of reactive oxygen species on normal and abnormal function of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 58, n. 2, p. 299-300, 2002.

BARCELLOS B.P.; ROCHA, M.A.; JAMAS, L.; BRANDÃO, F.Z.; NOGUEIRA, L.G.; PINHO, T.G. Efeito dos meios diluidores MMC (mínima contaminação) e LGM (lactose-gema modificado) na viabilidade do sêmen de cães conservado por 24 horas em Equitainer®. **Ci. Anim. Bras.**, v. 12, n. 1, p. 126-133, 2011.

BARROS, T.B.; TONIOLLI, R. Uso potencial da água de cocona tecnologia de sêmen. **Ver. Bras. Reprod. Anim.**, v. 35, n. 4, p. 400-407, 2011.

BEDFORD, J.M.; MILLAR, R.P. The character of sperm maturation in the epididymis of the ascrotal hyrax, *Procavia capensis* and armadillo, *Dasypus novemcinctus*. **Biol. Reprod.**, v. 19, p. 396-406, 1978.

BENNETTS, L.E.; AITKEN, R.J. A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 71, n. 1, p. 77-87, 2005.

BEZERRA, A.M.R.; RODRIGUES, F.H.G.; CARMIGNOTTO, A.P. Predation of rodents by the yellow armadillo (*Euphractus sexcinctus*) in Cerrado of Central Brazil. **Mammalia**, v. 65, n. 1, p. 86-88, 2001.

BEZERRA, F.S.; CASTELO, T.S.; ALVES, H.M.; OLIVEIRA, I.R.; LIMA, G.L.; PEIXOTO, G.C.; BEZERRA, A.C.; SILVA, A.R. Objective assessment of the cryoprotective effects of dimethylformamide for freezing goat semen. **Cryobiology**, v. 63, n. 3, p. 263-266, 2011.

BLANC-LAYRAC, G.; BRINGUIER, A.F.; GUILLOT, R.; FELDMANN, G. Morphological and biochemical analysis of cell death in human ejaculated spermatozoa. **Cell. Mol. Biol.**, v. 46, p. 187-197, 2000.

BLOOM, E. A rapid staining method using eosin-nigrosin to distinguish between live and dead spermatozoa. **Anim. Breeding Abstracts**, v. 18, 1390 pp. 1950.

BOITRELLE, F.; ALBERT, M.; THEILLAC, C.; FERFOURI, F.; BERGERE, M.; VIALARD, F.; WAINER, R.; BAILLY, M.; SELVA, J. Cryopreservation of human spermatozoa decreases the number of motile normal spermatozoa, induces nuclear vacuolization and chromatin decondensation. **J. Androl.**, v. 33, n. 6, p. 1371-1378, 2012.

BONATO, V. **Ecologia e história natural de tatus do cerrado de Itirapina, São Paulo (Xenarthra: Dasypodidae)**. 2002. 80f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2002.

BOUCHARD, G.F.; MORRIS, J.K.; SIKES, J.D.; YOUNGQUIST, R.S. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa motility. **Theriogenology**, v. 34, p. 147- 157, 1990.

BRAUN, J.; TORRES-BOGGINO, F.; HOCHI, S.; OGURI, N. Effect of seminal plasma on motion characteristics of epididymal and ejaculated stallion spermatozoa during storage at 5 °C. **Dtsch Tieraerztl Wschr.**, v. 101, p. 319-22, 1994.

BRITO, L.F.; SERTICH, P.L.; STULL, G.B.; RIVES, W.; KNOBBE, M. Sperm ultrastructure, morphometry, and abnormal morphology in American black bears (*Ursus americanus*). **Theriogenology**, v. 74, n. 8, p. 1403-1413, 2010.

BUHR, M.M.; CURTIS, E.F.; KAKUDA, N.S. Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boarsperm. **Cryobiology**, v. 31, n. 3, p. 224-38, 1994.

BURANT, C.F.; DAVIDSON, N.O. GLUT3 glucose transporter isoform in rat testis: localization, effect of diabetes mellitus, and comparison to human testis. **Am. J. Physiol.**, v. 267, p. 1488-1495, 1994.

CARDOSO, F.M.; FIGUEIREDO, E.; GODINHO, H.; COSER, A.M. Variação sazonal da atividade secretória das glândulas genitais acessórias masculinas de tatus *Dasypus Novemcinctus* Linnaeus, 1758. **Rev. Bras. Biol.**, v. 45, n. 4, p. 507-514, 1985.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. **Theriogenology**, v. 59, p. 743-75, 2003.

CARDULLO, R.A.; CONE, R.A. Mechanical immobilization of rat sperm does not exchange their oxygen consumption rate. **Biol. Reprod.**, v. 34, p. 820-830, 1986.

CARVER, D.A.; BALL, B.A. Lipase activity in stallion seminal plasma and effect of lipase on stallion spermatozoa during storage at 5 °C. **Theriogenology**, v. 58, p. 1587-95, 2002.

CASTELO, T.S.; BEZERRA, F.S.B.; LIMA, G.L.; ALVES, H.M.; OLIVEIRA, I.R.S.; SANTOS, E.A.A.; PEIXOTO, G.C.X.; SILVA, A.R. Effect of centrifugation and sugar supplementation on the semen cryopreservation of captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*). **Cryobiology**, v. 61, p. 275-279, 2010a.

CASTELO, T.S.; BEZERRA, F.S.B.; SOUZA, A.L.; MOREIRA, M.A.; PAULA, V.V.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. Influence of the thawing rate on the cryopreservation

of semen from collared peccaries (*Tayassu tajacu*) using Tris-based extenders. **Theriogenology**, v. 74, n. 6, p. 1060-1065, 2010b.

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

CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**, 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. p.49.

CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação de sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 186f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal). Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2005.

CELEGHINI, E.C.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; ANDRADE, A.F.C.; ARRUDA, R.P. Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 62, n. 3, p. 536-543, 2010.

CETICA, P.D; SASSAROLI, J.; MERANI, M.S; SOLARI, A. Comparative spermatology in Dasipodidae: *Priodontes maximus*, *Chaetophractus villosus* and *Dasypus hybridus*. **Biocell**, v.18, p. 89-103, 1993.

CETICA, P.D.; SOLARI, A.J.; MERANI, M.S.; DE ROSAS, J.C.; BURGOS, M.H. Evolutionary sperm morphology and morphometry in armadillos. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v. 30, n. 2, p. 309-314, 1998.

CHOE, C.Y.; KIM, J.G.; CHO, S.R.; SON, D.S.; KIM, Y.K.; BALASUBRAMANIAN, S.; CHOE, S.Y.; RHO, G.J. Influence of seasons, extenders, slow and rapid freezing on seminal characters in korean native bucks. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 41, p. 55-60, 2006.

CITES. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. Versão Online. Disponível em: <<http://www.cites.org/eng/resources/species.html>> Acesso em: 5 jan. 2013.

COLOMA, M.A.; GÓMEZ-BRUNET, A.; VELÁZQUEZ, R.; TOLEDANO-DÍAZ, A.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A.; SANTIAGO-MORENO, J. Freezability of Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) spermatozoa according to the glycerolization temperature and plasma testosterone concentration. **Cryobiology**, v. 61, n. 2, p. 204-210, 2010.

COUNTERS, J.L.; EKWALL, H.; PAQUIGNON, M.; PLOEN, L. Preliminary study of water and some element contents in boar spermatozoa, before, during and after freezing. **J. Reprod. Fertil.**, v. 87, p. 613-26, 1989.

CRISTER, J.K.; HUSE-BRENDA, A.R.; AAKER, D.V.; ARNESON, B.W.; BALL, G.D. Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of cryoprotectants on motility. **Fertil. Steril.**, v. 50, n. 2, p. 314-320, 1998.

CUÉLLAR, E. **Biology and ecology of armadillos in the bolivian chaco in vizcaino lf, loughry wjeds the biology of Xenarthra**. Gainesville: University Press of Florida, 2008.

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

DALPONTE, J.C.; TAVARES-FILHO, J.A. Diet of the yellow armadillo, *Euphractus sexcinctus*, in South-Central Brazil. **Edentata**, v. 6, p. 37-41, 2004.

DELSUC, F.; STANHOPE, M.J.; DOUZERY, E.J.P. Molecular systematic of armadillos (Xenarthra, Dasypodidae): contribution of maximum like-lihood and bayesian analyses of mitochondrial and nuclear genes. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 28, p. 261–275, 2003.

DESBIEZ, A.L.J.; LIMA BORGES, P.A.; MEDRI, I.M. Chasing behavior in yellow armadillos, *Euphractus sexcinctus*, in the Brazilian Pantanal. **Edentata**, v. 7, p. 51-53, 2006.

DIMITROPOULOS, E. La signification du test de la thermoresistance dans l'appreciation de valeur fécondante du sperme congelé. Meaning of the thermoresistance test for the evaluation of fertilizing ability of frozen sperm. **Ann. Méd. Vet.**, v. 4, p. 215–24, 1967.

DONOGHUE, A.M.; GARNER, D.L.; DONOGHUE, D.J.; JOHNSON, L.A. Viability assessment of turkey sperm using fluorescent staining and flow cytometry. **Poult. Sci.**, v. 74, p. 1191-200, 1995.

DREVIUS, L.; ERIKSSON, H. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. **Exp. Cell Res.**, v. 42, p. 136-5, 1966.

DURU, N. K.; MORSHEDI, M. S.; SCHUFFNER, A.; OEHNINGER, S. Cryopreservation-Thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation. **J. Androl.**, v. 22, n.4, p.646-651, 2001.

ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review. **J. Reprod. Fertil.**, v. 27, p. 243-255, 1993.

ERDMANN, R.H. **Exame reprodutivo, contenção farmacológica e criopreservação de semen em gato-do-mato pequeno (*Leopardus tigrinus* Schreber 1775)**. 2005. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Paraná, PR, 2005.

ESTESO, M.C.; FERNANDEZ-SANTOS, M.R.; SOLER, A.J.; MONTORO, V.; QUINTERO-MORENO, A.; GARDE, J.J. The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal sperm heads. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 41, p. 241–246, 2006.

FALLABRINO, A.; CASTIÑEIRA, E. Situación de los edentados en Uruguay. **Edentata**, v. 7, p. 1-3, 2006.

FAVORETTO, S.M.; ZANETTI, E.S.; DUARTE, J.M. Cryopreservation of red brocket deer semen (*Mazama americana*): comparison between three extenders. **J. Zoo. Wildl. Med.**, v. 43, n. 4, p. 820-7, 2012.

FORTUNATO, A.; LEO, R.; LIGUORI, F. Effects of cryostorage on human sperm chromatin integrity. **Zygote**, v. 8, p. 1-7, 2012.

FOULKES, J. A. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v. 49, p. 277-284, 1977.

GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; JOERG, H.W.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. Fluorometric assessment of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v. 57, p. 1401-6, 1997.

GONCALVES, D.E.; ANDRADE, F.A.; FERNANDES, M.E.B; BARROS, M.C.; SCHNEIDER, H. A range extension for the yellow armadillo *Euphractus sexcinctus* Linnaeus, 1758 (Xenarthra, Dasypodidae), in the eastern Brazilian Amazon. **Edentata**, v. 7, p. 25-30, 2006.

GONZALEZ, R.A.F. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e integridade de membranas do espermatozoide bovino.** 2004. 92f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, SP, 2004.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Vet. Clin. N. Am-Equine**, v. 12, n. 1, p. 131-147, 1996.

GRAVANCE, C.G.; GARNER, D.L.; MILLER, M.G.; BERGER, T. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. **Reprod. Toxicol.**, v. 15, p. 5–10, 2001.

GUCWINSKA, H. Development of six-banded armadillos *Euphractus sexcinctus* at wroclaw zoo. **Int. Zoo Yearb.**, v. 11, p. 88-89, 1971.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **J. Androl.**, v. 11, n. 1, p. 73-88, 1990.

HAY, M.A.; KING, W.A.; GARTLEY, C.J.; LEIBO, S.P.; GOODROWE, K.L. Canine spermatozoa - Cryopreservation and evaluation of gamete interaction. **Theriogenology**, v. 48, p. 1329- 1342, 1997.

HEATH, E.; SCHAEFFER, N.; MERITT DA, J.R.; JEYENDRAN, R.S. Rouleaux formation by spermatozoa in the naked-tail armadillo, *Cabassous unicinctus*. **J. Reprod. Fertil.**, v. 79, p. 153-158, 1987.

HENRY, M.; SNOECK, P. P. N.; COTTORELLO, A .C. P. Post-thaw spermatozoa plasma membrane integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants. **Theriogenology**, v. 58, n. 2-4, p. 245-248, 2002.

HERNÁNDEZ-LÓPEZ, L.; CEREZO-PARRA, G.; CERDA-MOLINA, A.L.; PÉREZ-BOLAÑOS, S.C.; MONDRAGÓN-CEBALLOS, R. Digestion by trypsin enhances assessment of sperm parameters in the black-handed spider monkey (*Ateles geoffroyi*). **Reproduction**, v. 136, p. 411-421, 2008.

HERRICK, J.R.; CAMPBELL, M.K.; SWANSON, W.F. Electroejaculation and semen analysis in the La Plata Three-banded armadillo (*Tolypeutes matacus*). **Zoo Biol.**, v. 21, p. 481-487, 2002.

HIWASA, M.; SUZUKI, Y.; WATANABE, H.; BHUIYAN, M. M.; MATSUOKA, K.; FUJISE, Y.; ISHIKAWA, H.; OHSUMI, S.; FUKUI, Y. Effects of semen extenders and storage temperatures on characteristics of frozen-thawed Bryde's (*Balaenoptera edeni*) whale spermatozoa. **J. Reprod. Dev.**, v. 55, n. 6, p. 599-606, 2009.

HOE, F.G.H.; SOUSA, F.F.; RINCA, L.; LOPES, M.D. Efeito do diluidor sobre a viabilidade das células espermáticas caninas, mantidas a 37°C. **Rev. Bras. Reprod. Ani.**, v. 25, p. 466-468, 2001.

HUANG, S.Y.; KUO, Y.H.; LEE, W.C.; TSOU, H.L.; LEE, Y.P.; CHANG, H.L.; WU, J.J.; YANG, P.C. Substantial decrease of heat-shock protein hsp90 precedes the decline of sperm motility during cooling of boar spermatozoa, **Theriogenology**, v. 51, p. 1007-1016, 1999.

IUCN. Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN, Versão Online. Disponível em: < <http://www.iucnredlist.org/search/details.php/8306/all> > Acesso: 5 jan. 2013.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology**, v. 60, p. 743-758, 2003.

JANUSKAUSKAS, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm viability by measurement of ATP, membrane integrity and motility in frozen/thawed bull semen. **Acta Vet. Scand.**, v. 36, n. 4, p. 571-4, 1995.

JASKO, D.K.; MORAN, D.M.; FARLIN, M.E.; SQUIRES, E.L. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. **Theriogenology**, v. 47, p. 490-496, 1997.

JASKO, D.P. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars. Vet.**, v.10, n. 2, p. 156-165, 1994.

JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L.J. Developed of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other sperm characteristics. **J. Reprod. Fertil.**, v. 70, p. 219-228, 1984.

JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. Semen collection, evaluation, and preservation. In: JOHNSTON SD, KUSTRITZ MVR, OLSON PNS. **Canine and Feline Theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. p. 287-306.

JONES, R.T.; MARTIN, I.C.A.; The effects of dilution, egg yolk and cooling to 5 °C on the ultrastructure of ram spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v. 35, p. 311-320, 1973.

KARABINUS, D.S.; EVENSON, D.P.; KAPROTH, M.T. Effects of egg yolk-citrate and milk extenders on chromatin structure and viability of cryopreserved bull sperm. **J. Dairy Sci.**, v. 74, n. 11, v. 3836-3848, 1991.

KATKOV, I.I.; MAZUR, P. Influence of centrifugation regimes on motility, yield and cell associations of mouse spermatozoa. **J. Androl.**, v. 19, p. 232-241, 1998.

KNOLL, M.; RUSKA, E. The electron microscope, In: ZEITS. F. **Physik**, v. 78, 1932. p. 318-339.

KOBER, C. **Vergleichende Untersuchungen von Verdünnern zur Spermakonservierung bei Schwein, Pferd und Hund unter besonderer Berücksichtigung physikalischer Eigenschaften**. 1985. p. 151-152. Dissertation, Ludwig- Maximilians Universität München, München, Alemanha, 1985.

KOONJAENAK, S.; PONGPENG, P.; WIROJWUTHIKUL, S.; JOHANNISSON, A.; KUNAVONGKRIT, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Seasonality affects post-thaw plasma membrane intactness and sperm velocities in spermatozoa from Thai AI swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 67, n. 9, p. 1424-35, 2007.

KUMAR, R.; ATREJA, S.K. Effect of incorporation of additives in tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm tyrosine phosphorylation during cryopreservation. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 47, n. 3, p. 485-90, 2012.

LI, H.Y.; ZHANG, X.F.; WANG, D.; CHEN, D.Q. Ultrastructure of the spermatozoa of the Yangtze finless porpoise (*Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*). **Anat. Histol. Embryol.**, v. 38, n. 4, p. 300-304, 2009.

LIMA, E.M.; MUNIZ, I.C.M.; OHANA, J.A.B.; SILVA E SOUSA JUNIOR, J. Ocorrência de *Euphractus sexcinctus* (Xenarthra: Dasypodidae) na Região do Médio Rio Amazonas. **Edentata**, v. 8, n. 10, p. 58-60, 2009.

LIMA, G.L.; BARROS, F.F.; COSTA, L.L.; CASTELO, T.S.; FONTENELE-NETO, J.D.; SILVA, A.R. Determination of semen characteristics and sperm cell ultrastructure of captive coatis (*Nasua nasua*) collected by electroejaculation. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 115, n. 1-4, p. 225-30, 2009.

LOCKYEAR, K. M.; GOODROWE, K.L.; WADDELL, W.T.; MACDONALD, S.E. Comparison of different osmolalities and egg-yolk composition in processing media for the

cryopreservation of red wolf (*Canis rufus*) sperm. **Theriogenology**, v. 71, n. 3, p. 469-79, 2009.

MAMPOUYA, C. **Etude de la survie et de la fécondance du sperm de béliet après conservation à l'état liquide congelé**. 1973. Thèse Docteur de Troisième Cycle. U.E.R. Sciences Exactes et Naturelles – Université de Clermont – Ferrand, France, 1973.

MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MÉNARD, M. Major Proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biol. Reprod.**, v. 67, p. 1250-1258, 2002.

MANNHEIMER, W.A. **Microscopia dos materiais**. Rio de Janeiro: E-pappers serviços editoriais LTDA, 2002. 221p.

MARTIN, G.; SABIDO, O.; DURAND, P.; LEVY, R. Cryopreservation induces an apoptosis like mechanism in bull sperm. **Biol Reprod.**, v. 71, p. 28–37, 2004.

MAZUR, P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates, **Cryobiology**, v. 14, p. 251–272, 1977.

MCDONOUGH, C. M.; LOUGHRY, W. J. Armadillos (Dasypodidae). In: HUTCHINS, M. **Grzimek's Animal Life Encyclopedia**. (ed.), vol. 13 (Mammals II), Gale Group, Farmington Hills. 2003. p.181-192.

MCDONOUGH, C. M.; LOUGHRY, W. J. Armadillos. In: MACDONALD, D. **The New Encyclopedia of Mammals**. (ed.), Oxford University Press, Oxford. 2001. p.796-799.

MCNAB, B. K. Energetics and the limits to a temperate distribution in armadillos. **J. Mamm.**, v. 61, n. 4, p. 606-627, 1980.

MCNAB, B. K. Energetics, population biology, and distribution of Xenarthrans. living and extinct. In: MONTGOMERY, G. G. **The Evolution and Ecology of Armadillos, Sloths and Vermilinguas.** (ed.), Smithsonian Institution Press, Washington and London. 1985. p.219-232.

MCPHAIL, D.B.; GOODMAN, B.A. Tris buffer – a case for caution in its use for cooper containing systems. **Bioch. J.**, v. 221, p. 559-560, 1984.

MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, p. 327-344, 2002.

MEDRI, Í. M. **Ecologia e história natural do tatu-peba, *Euphractus sexcinctus* (Linnaeus, 1758), no Pantanal da Nhecolândia, Mato Grosso do Sul.** 2008. 187f. Tese (Doutorado em Ecologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Distrito Federal, DF, 2008.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial.** 5.ed. Porto Alegre: Sulina, 1982. 783p.

MOSAFERI, S.; NIASARI-NASLAJI, A.; ABARGHANI, A.; GHARAHDAAGHI, A.A.; GERAMI, A. Biophysical and biochemical characteristics of Bactrian camel semen collected by artificial vagina. **Theriogenology**, v. 63, p. 92-101, 2005.

MUKAI, C.; OKUNO, M. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. **Biol. Reprod.**, p. 71, n. 5, p. 40–47, 2004.

NERIS, N.; COLMAN, F.; OVELAR, E.; SUKIGARA, N.; ISHII, N. **Guía de mamíferos medianos y grandes del Paraguay:** distribución, tendencia poblacional y utilización - SEAM, Asunción. 2002.

NG, S.C.; BONGSO, T.A.; SATHANANTHAN, H.; TOK, V.C.N.; RATNAM, S.S. Microcentrifugation of human spermatozoa: its effect on fertilization of hamster oocytes after micro-insemination spermatozoal transfer. **Hum. Reprod.**, v. 5, p. 209-211, 1990.

NOAKES, D.E.; PARKINSON, T.J.; ENGLAND, G.C.W. **Veterinary Reproduction and Obstetrics**, 8.ed. Saunders, 2001.

NOWAK, R.M. **Walker's mammals of the world**. 6 ed. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press, 1999. p. 836.

NUNES, J. F. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de animais domésticos e do homem. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 22, n. 2, p. 109-112, 1998.

NUNES, J.F.; COMBARNOUS, Y. Utilização da água de coco e suas frações ativas como diluidor do sêmen dos mamíferos domésticos. In: 1º. SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE ANIMAIS DOMÉSTICOS, 1995, Fortaleza, CE. **Anais...** 1995. p. 63.

NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M. Utilização da água de coco como diluidor de sêmen de caprinos e ovinos. **Rev. Cient. Prod. Animal**, v. 1, n. 1, p.17-26, 1999.

OETTLÉ, E. E. Sperm morphology and fertility in the dog. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.47, p.257-260, 1993.

OETTLÉ, E.E.; SOLEY, J.T. Infertility in a malttese poodle as a result of a sperm midpiece defect. **J. S. Afr. Vet. Assoc.**, v. 56, p. 103-106, 1985.

OLIVEIRA, K. G.; MIRANDA, S. A.; LEÃO, D. L.; BRITO, A. B.; SANTOS, R. R.; DOMINGUES, S. F. Semen coagulum liquefaction, sperm activation and cryopreservation of capuchin monkey (*Cebus apella*) semen in coconut water solution (CWS) and TES-TRIS. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 123, p. 75-80, 2011.

OLIVEIRA, R.V.; NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M.; CAVALCANTE, J.M.M.; MOURA, A.A.A.; ARAÚJO, A.A. Avaliação morfológica de espermatozoides caprinos

diluídos e congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101) ou TRIS, corados por eosina-nigrosina e azul de bromofenol. **Ci. Anim. Bras.**, v. 10, n. 3, p. 862-869, 2009.

PAASCH, U.; GRUNEWALD, S.; DATHE, S.; GLANDER, H. J. Mitochondria of human spermatozoa are preferentially susceptible to apoptosis. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1030, p. 403-9, 2004.

PADRON, O.F.; BRACKETT, N.L.; SHARMA, R.K.; LYNNE, C.M.; THOMAS, A.J. JR.; AGARWAL, A. Seminal reactive oxygen species and sperm motility and morphology in men with spinal cord injury. **Fertil. Steril.**, v.67, n.6, p.1115-20, 1997.

PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, n. 2, p. 209-222, 1992.

PELLICER-RUBIO, M.; COMBARNOUS, Y. Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. **J. Reprod. Fertil.**, v. 112, p. 95-105, 1998.

PEÑA-MARTINEZ, I. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 82-83, p. 209- 224, 2004.

PERES, M.A.; BENETTI, E.J.; MILAZZOTTO, M.P.; VISINTIN, J.A.; MIGLINO, M.A.; ASSUMPÇÃO, M.E. Collection and evaluation of semen from the three-toed sloth (*Bradypus tridactylus*). **Tissue Cell**, v. 40, p. 325–331, 2008.

PHILLIP, F.V. **Congelação do sêmen bovino**. 2010. 13f. Especialização (Produção e Reprodução de Bovinos) – Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro, RJ, 2010.

PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation. In: Thecniques for Freezing Mammalian Embryos. **Proceedings...**, Fort Collins: Colorado State University, p. 1-5, 1998.

PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Cryopreservation of semen. IN: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea e Febiger, 1992. cap. 83, p. 769-789.

POCOCK, R. I. The external characters of the south american edentates. **Proceedings...** Of the Zoological Society of London. v. 63, p. 983-1031, 1924.

PONS-REJRAJI, H.; SION, B.; SAEZ, F.; BRUGNON, F.; JANNY, L.; GRIZARD, G. Role of reactive oxygen species (ROS) on human spermatozoa and male infertility. **Gynecol. Obstet. Fertil.**, v. 37, n. 6, p. 529-35, 2009.

PURSWELL, B.J.; LTHOUSE, G. C.; ROOT, M. V. Guidelines for using the canine breeding soundness evaluation form. In: MONTGOMERY, AL. **Annual Meeting of the Society for Theriogenology**, 1992.

QUINN, P.J.; WHITE, I.G.; CLELAND, K.W. Chemical and ultrastructure changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. **J. Reprod. Fertil.**, v. 18, p. 209-220, 1969.

RAVAGNAN, L.; ROUMIER, T.; KROEMER, G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. **J. Cell Physiol.**, v. 192, p. 131-137, 2002.

REDFORD, K.H.; WETZEL, R.M. *Euphractus sexcinctus*. **Mammalian Species**, v.252, p.1-4, 1985.

ROBERTSON, L.; WATSON, P.F. Calcium transport in diluted or cooled ram semen. **J. Reprod. Fertil.**, v. 77, p. 177-185, 1986.

SA-ARDRIT, M.; SAIKHUN, J.; THONGTIP, N.; DAMYANG, M.; MAHASAWANGKUL, S.; ANGKAWANISH, T.; JANSITTIWATE, S.; FAISAIKARM, T.; KITIYANANT, Y.; PAVASUTHIPAISIT, K.; PINYOPUMMIN, A. Ultrastructural alterations of frozen-thawed Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa. **Int. J. Androl.**, v. 29, p. 346-352, 2006.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.; Storage of ram semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 62, p. 77-111, 2000.

SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F.; OLIVEIRA, K.P.L.; VIEIRA, V.E.; GONDIM, J.M.; MATEOS-REX, E. Utilização de diluentes à base de água de coco in natura e em pó na inseminação artificial programada de cabras. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 5, p. 96-98, 2002.

SANTIAGO-MORENO, J.; CASTAÑO, C.; TOLEDANO-DÍAZ, A.; ESTESO, M.C.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A.; GUERRA, R.; RUIZ, M.J.; MENDOZA, N.; LUNA, C.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; HILDEBRANDT, T.B. Cryopreservation of aoudad (*Ammotragus lervia sahariensis*) sperm obtained by transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands and electroejaculation. **Theriogenology**, v. 15, n. 79(2), p. 383-91, 2013.

SANTOS, E.A.A.; SOUSA, P.C.; DIAS, C.E.V.; CASTELO, T.S.; PEIXOTO, G.C.X.; LIMA, G.L.; RICARTE, A.R.F.; SIMÃO, B.R.; FREITAS, C.I.A.; SILVA, A.R. Assessment of sperm survival and functional membrane integrity of the six-banded armadillo (*Euphractus sexcinctus*). **Theriogenology**, v. 76, n. 4, p. 623-9, 2011.

SARAIVA, K.L.A.; SILVA, A.K.S.E.; WANDERLEY, M.I.; ARAÚJO, A.A.A.; SOUZA, J.R.B.; PEIXOTO, C.A. Chronic treatment with sildenafil stimulates Leydig cell and testosterone secretion. **Int. J. Ex. Pathol.**, v. 90, p. 454-462, 2009.

SAUNDERS, K.M.; PARKS, J.E. Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of in vitro-matured bovine oocytes. **Biol. Reprod.**, v. 61, p. 178-187, 1999.

SCHULZE, M.; RUEDIGER, K.; MUELLER, K.; JUNG, M.; WELL, C.; REISSMANN, M. Development of an in vitro index to characterize fertilizing capacity of boar ejaculates. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 140, n. 1-2, p. 70-6, 2013.

SCHURMANN, A.; AXER, H.; SCHEEPERS, A.; DOEGE, H.; JOOST, H.G. The glucose transport facilitator GLUT8 is predominantly associated with the acrosomal region of mature spermatozoa. **Cell. Tissue. Res.**, v.307, p.237-42, 2002.

SERAFIM, M.K.B.; LIRA, R.A.; COSTA, L.L.M.; GADELHA, I.C.N.; FREITAS, C.I.A.; SILVA, A.R. Description of semen characteristics from six-banded armadillos (*Euphractus sexcinctus*) collected by electroejaculation. **Anim. Reprod. Sci.**, v.118, p. 362–5, 2010.

SILVA, A. R. **Criopreservação do sêmen canino diluído em Tris: Avaliação morfológica, funcional e de suas interações com oócitos homólogos.** 2005. 165f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza, CE, 2005.

SILVA, A.R., CARDOSO, R.C.S., SILVA, L.D.M. Congelação de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores à base de Tris e água de coco. **Ci. Rur.**, v.6, p.1021- 1025, 2000.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Quality of canine semen submitted to single or fractioned glycerol addition during the freezing process. **Theriogenology**, v. 59, p. 821-829, 2003.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Effect of Tris -buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. **Vet. J.**, v.164, p. 244-246, 2002.

SILVA, A.R.; FONTENELE-NETO, J.D.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M.; CHIRINÉA, V.H.; LOPES, M.D. Description of ultrastructural damages in frozen-thawed canine spermatozoa. **Ci. Anim. Brasi.**, v. 10, n. 2, p. 595-601, 2009.

SILVA, M.A.; PEIXOTO, G.C.; CASTELO, T.S.; LIMA, G.L.; SILVA, A.M.; OLIVEIRA, M.F., SILVA, A.R. Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasiprocta aguti*) using powdered coconut water (ACP-109c) and Tris extenders. **Theriogenology**, v. 76, n. 6, p. 1084-1089, 2011.

SILVA, M.A.; PEIXOTO, G.C.X.; LIMA, G.L.; BEZERRA, J.A.B.; CAMPOS, L.B.; PAIVA, A.L.C.; PAULA, V.V.; SILVA, A.R. Cryopreservation of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) semen using a powdered coconut water (ACP-116c) based extender plus

various concentrations of egg yolk and glycerol. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 605-611, 2012.

SILVA, M.A.; PEIXOTO, G.C.; CASTELO, T.S.; LIMA, G.L.; SILVA, A.M.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA AR. Cryopreservation of collared peccary (*Pecari tajacu*) semen using different freezing curves, straw sizes, and thawing rates. **Cryobiology**, v. 67, n. 1, p. 50-55, 2013.

SILVA, P.F.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 15, p. 65, n. 5, p. 958-978, 2006.

SIQUEIRA, J.B.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, E.P.; HENRY, M.;TORRES, C.A.A.; SILVA, M.G.V.B.; SILVEIRA, T.S. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática *in vitro*. **R. Bras. Zootec.**, v. 36, n. 2, p. 387-395, 2007.

SNOECK, P.P.N. **Aspectos da criopreservação de sêmen eqüino: composição do meio diluidor, curvas de congelamento e fertilidade**. 2003. 116f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2003.

SOARES, M.P.; BRANDELLI, A.; CELEGHINI, E.C.; ARRUDA, R.P.; RODRIGUEZ, S.A. Effect of cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 isomers of conjugated linoleic acid on the integrity and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa. **Cryobiology**, v. 67, n. 1, p. 102-5, 2013.

SOUSA, E.; SILVA JUNIOR J.; NUNES, A. P. The disjunct geographical distribution of the Yellow Armadillo *Euphractus sexcinctus* (Xenarthra, Dasypodidae). **Edentata**, v. 4, p. 16-18, 2001.

SOUSA, P.C. **Análise morfológica, morfométrica e ultraestrutural das células espermáticas de Tatu-Peba (*Euphractus sexcinctus*, Linnaeus, 1758)**. 2009. 97f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Pró-Reitoria de Ensino e Graduação. Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, 2009.

SOUSA, P.C.; SANTOS, E.A.A.; BEZERRA, J.A.B.; LIMA, G.L.; CASTELO, T.S.; FONTENELE-NETO, J.D.; SILVA, A.R. Morphology, morphometry and ultrastructure of captive six-banded armadillo (*Euphractus sexcinctus*) sperm. **Anim. Reprod. Sci.**, v.140, n. 3-4, p. 279-285, 2013.

SPITTALER, P.J.; TYLER, J.P.P. Further evaluation of a simple test for determining the integrity os spermatozoal membrane. **Clin. Reprod. Fertil.**, v. 3, p. 187-190, 1985.

SPUGIN, B.; MARGALIT, I.; BREITBART, H. Sperm exocytosis reconstructed in a cell free system. Evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. **J. Cell. Sci.**, v. 108, p. 2525-2535, 1995.

STOOPS, M.A.; ATKINSON, M.W.; BLUMER, E.S.; CAMPBELL, M.K.; ROTH, T.L. Semen cryopreservation in the indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*). **Theriogenology**, v. 73, p. 1104-1115, 2010.

STRÖM, B.; ROTA, A.; LINDE-FORSBERG, C. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. **Theriogenology**, v. 48, p. 247-256, 1997.

STRZEZEK, J.; KORDAN, W.; KOSTYRA, H.; ZABORNIK, A. Purification and partial characterization of 5700Da sperm motility inhibiting factor for seminal plasma of boar. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 29, p. 35-52, 1992.

TARTAGLIONE, C.M.; RITTA, M.N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-tawed bull semen. **Theriogenology**, v. 62, n. 7, p. 1245-1252, 2004.

VALEUR, B. **Molecular Fluorescence: Principles and Applications**. Weinheim (Federal Republic of Germany): Wiley-VCH Verlag GmbH. 2002. 399p.

VIANNA, F.P.; PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; MELO, C.M.; DELL'AQUA JR, J.A. Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreserved bull semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 13, p. 279-282, 2009.

VIEIRA, L.A.; GADEA, J.; GARCÍA-VÁZQUEZ, F.A.; AVILÉS-LÓPEZ, K.; MATÁS, C. Equine spermatozoa stored in the epididymis for up to 96h at 4°C can be successfully cryopreserved and maintain their fertilization capacity. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 136, p. 280-288, 2013.

VILLAYERDE, A.I.; MELO, C.M.; MARTIN, I.; FERREIRA, T.H.; PAPA, F.O. TACONELLI, C.A.; LOPES, M.D. Comparison of efficiency between two artificial insemination methods using frozen-tawed semen in domestic cat (*Felis catus*). **Anim. Reprod. Sci.**, v. 114, n.4, p.434-42, 2009.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of their post-thawing function. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 7, p. 871-891, 1995.

WISHWANATH, R.; SHANNON, P.; CURSON, B. Cationic extracts of egg yolk and their effects on motility, survival and fertilizing ability of bull sperm. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 29, p. 185-194, 1992.

ZAMBELLI, D.; CUNTO, M. Semen collection in cats: Techniques and analysis. **Theriogenology**, v. 66, p. 159-165, 2006.

ZEE, Y.P.; HOLT, W.V.; ALLEN, C.D.; NICOLSON, V.; BURRIDGE, M.; LISLE, A.; CARRICK, F.N.; JOHNSTON, S.D. Effects of cryopreservation on mitochondrial function and heterogeneity, lipid raft stability and phosphatidylserine translocation in koala (*Phascolarctos cinereus*) spermatozoa. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.19, n.7, p.850-60, 2007.

ZHANG, Y.X., PING, S.H., YANG, S.H. Morphological characteristics and cryodamage of Chinese tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) sperm. **Dongwuxue Yanjiu**, v. 3, n. 1, p. 29-36, 2012.

2 CAPÍTULO 2 – EFEITOS DA CENTRIFUGAÇÃO SOBRE A VIABILIDADE DO SÊMEN DE TATUS-PEBA (*Euphractus sexcinctus*) EM DILUENTES À BASE DE TRIS E ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP-119®)

Effects of centrifugation on the viability of the six-banded armadillos (*Euphractus sexcinctus*) semen using Tris and Powdered Coconut Water (ACP-119®) extenders

Patrícia da Cunha Sousa, Erika Aparecida Araújo dos Santos, Andréia Maria Silva, Thibério de Souza Castelo, Gislayne Cristhiane Xavier Peixoto, Carlos Iberê Alves Freitas, Alexandre Rodrigues Silva

Submetido à revista *Ciência Rural* em 30/07/2013

EFEITOS DA CENTRIFUGAÇÃO SOBRE A VIABILIDADE DO SÊMEN DE TATUS-PEBA (*Euphractus sexcinctus*) EM DILUENTES À BASE DE TRIS E ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP-119®)

2.1 RESUMO

Foram avaliados os efeitos da centrifugação associada ao uso de diferentes diluentes na manutenção da viabilidade espermática em tatus-peba (*Euphractus sexcinctus*) ao longo do teste de termorresistência (TTR). Amostras de sêmen (n=12) oriundas de 04 machos adultos coletados por eletroejaculação foram divididas em quatro alíquotas, sendo duas imediatamente diluídas em Tris ou água de coco em pó (ACP-119®), e as outras duas centrifugadas (800 g/10 min) previamente à diluição. As amostras foram incubadas a 34°C por 3h, e os parâmetros seminais avaliados em intervalos de 1h. Em termos gerais, verificou-se uma redução da viscosidade espermática imediata à diluição em ambos os diluentes, independente do uso da centrifugação. Aos 60 minutos, verificou-se uma redução dos parâmetros avaliados ($P < 0,05$), embora o Tris tenha promovido uma melhor preservação dos mesmos ($P < 0,05$), quando comparado ao ACP-119® até os 120 minutos de avaliação. Após este período, os dois diluentes se equipararam ($P > 0,05$). Ainda, verificou-se um efeito deletério da centrifugação sobre a qualidade do sêmen de tatus-peba durante todo o teste de termorresistência. Em conclusão, recomenda-se o uso do Tris como diluente para o sêmen de tatus-peba, sendo desnecessária a realização de centrifugação prévia à diluição.

Palavras-chave: tatu-peba, termorresistência, sêmen, centrifugação, diluentes

2.2 ABSTRACT

The effects of the centrifugation associated to the use of different extenders on the viability of six-banded armadillo's (*Euphractus sexcinctus*) sperm were evaluated during a thermoresistance test (TRT). Semen samples (n=12) derived from 04 stud males collected by electroejaculation were divided in four aliquots; two of that were immediately diluted in Tris or powdered coconut water (ACP-119®), and the two others were centrifuged (800 g/10 min) previously to the dilution. Samples were incubated at 34 °C per 3 h, and the semen parameters were evaluated at each hour. In general, dilution in both extenders promoted a reduction in

seminal viscosity, independent of the centrifugation use. At 60 min, a decrease was verified for all semen parameters ($P < 0.05$), however they were better preserved in the use of Tris when compared to ACP-119[®] ($P < 0.05$) up to 120 min. After that, both diluents equated. In addition, centrifugation procedure presented a deleterious effect on the armadillo's semen quality during all the thermoresistance test. Thus, we recommend the use of the Tris as an extender for six-banded armadillo semen, and the previous centrifugation is unnecessary.

Key words: six-banded armadillo, thermoresistance, semen, centrifugation, extenders

2.3 INTRODUÇÃO

Os *Euphractus sexcinctus*, conhecidos popularmente como tatus-peba ou tatus-amarelos, encontram-se distribuídos em praticamente todos os biomas brasileiros (ANACLETO et al., 2006). Haja vista não serem considerados sob ameaça, têm sido sugeridos como modelos experimentais para espécies em risco de extinção, como os tatus-bola (*Tolypeutes sp.* - IUCN, 2013). Apesar da importância ecológica, estudos relacionados à reprodução dos tatus, bem como de todos os componentes da ordem Xenartra, são ainda escassos (HEATH et al., 1987; SERAFIM et al., 2010; SANTOS et al., 2011). Este fato tem limitado o desenvolvimento de tecnologias que posam maximizar sua reprodução, como por exemplo a preservação de seus gametas seguida de inseminação artificial. Ainda, denota-se a necessidade de adaptação de diluentes adequados às características peculiares do sêmen de tatus-peba, tais como a elevada viscosidade do plasma seminal (SERAFIM et al., 2010; SANTOS et al., 2011; SOUSA et al., 2013).

Fatores relacionados com a elevada viscosidade são considerados limitantes durante o processamento do sêmen em outras espécies (MOSAFERI et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2011). A fim de reverter essa problemática, foi descrita a liquefação do sêmen e manutenção da viabilidade espermática em camelos (*Camelus bactrianus*) empregando-se a diluição em solução a base de Tris (MOSAFERI et al., 2005), o qual já foi inclusive utilizado no próprio tatu-peba (SANTOS et al., 2011). Na busca de alternativas de menor custo, tem sido desenvolvidas soluções à base de água de coco (ACP[®]), que têm demonstrado eficiência tanto na liquefação seminal como na manutenção da viabilidade espermática em espécies silvestres, como os macacos-prego (*Cebus apela* – OLIVEIRA et al. 2011).

Associado ao uso de diluentes, a centrifugação tem sido proposta como uma alternativa para remoção do plasma seminal e redução na contaminação por urina na amostra em várias espécies (ALVAREZ-RODRIGUEZ et al., 2013). Embora possibilite a adequação de taxas fidedignas de diluição, já foi demonstrado um efeito mecânico deletério da mesma sobre os espermatozoides de alguns mamíferos (CASTELO et al., 2010). Nos tatus, entretanto, o efeito da centrifugação sobre as amostra de sêmen permanece desconhecido.

Este trabalho objetivou avaliar o efeito da centrifugação associada ao uso dos diluentes à base de Tris e água de coco em pó (ACP-119[®]) sobre a manutenção da viabilidade do sêmen de tatus-peba (*E. sexcinctus*) ao longo do teste de termorresistência.

2.4 MATERIAL E MÉTODO

O estudo foi realizado com animais provenientes do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres – CEMAS da UFERSA (Registro IBAMA nº 1478912), situado em Mossoró, RN, localizada na região semiárida brasileira (5°10'S-37°10'W; temperatura: 27-29°C). Foram utilizados quatro tatus-peba machos adultos, com idade aproximada de 2 anos, pesando $3,25 \pm 0,2$ Kg. Eles foram confinados em tanques individuais, mantidos sob fotoperíodo natural (~12 h), alimentados uma vez por dia com ração para manutenção de cães (Pedigree[®], MARS, Campinas, Brasil) acrescida de vegetais, e água *ad libitum*. Exceto quando indicado, todas as substâncias utilizadas no experimento foram provenientes da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA.

Cada animal foi submetido a três procedimentos de eletroejaculação em intervalos de 15 a 21 dias. Para tanto, estes foram contidos com luvas apropriadas e medicados com xilazina -1mg/kg (Sedomin[®], König S.A., Buenos Aires, Argentina) e cetamina - 7mg/kg (Quetamina Injetável, Vetnil[®], São Paulo, Brasil) por via intramuscular (músculo vasto lateral da coxa), seguindo-se a manutenção do estado anestésico através de aplicação intravenosa de propofol - 5mg/kg (Propovan[®], Cristalia, Fortaleza, Brasil) em bolus (AMORIM et al. 2011). Os animais foram posicionados em decúbito dorsal, realizando-se a higienização das regiões peniana e perianal com solução fisiológica. Utilizou-se um eletroejaculador (Eletrojet[®], Eletrovet, São Paulo, SP, Brasil), conectado a uma fonte de 12 V, promovendo-se três ciclos sucessivos de estimulação, com 5 min de intervalo entre ciclos. O primeiro ciclo consistiu em 10 estímulos de 2, 3, e 4 mA, o segundo foi de 10 estímulos de 3, 4 e 5 mA, e o terceiro foi de

10 estímulos de 5 e 6 mA (SERAFIM et al., 2010). A sonda do eletroejaculador mede 12,5 cm (comprimento) e 1,0 cm (de diâmetro), apresentando dois eletrodos longitudinais. Cerca de 8 cm da sonda foi inserida no reto do animal.

O sêmen foi colhido em tubos plásticos cônicos graduados e avaliado quanto ao aspecto e coloração. O pH foi mensurado utilizando-se fitas apropriadas (Neutralit[®] Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). O volume foi aferido com o uso de micropipetas (5 a 100 µL). A motilidade (percentual de espermatozoides móveis) e o vigor (qualidade do batimento flagelar numa escala de 0-5) foram avaliados em microscópio de campo claro (Eclipse E200, Nikon, Melville, NY, USA) sob aumento de 100× e 400×. Foram confeccionados esfregaços de sêmen corados com rosa de Bengala (1:15) para avaliação da morfologia espermática; e outros corados com azul de bromo-fenol (1:1) para avaliação da integridade estrutural da membrana plasmática. Nos esfregaços, foram observadas 200 células/lâmina sob microscopia de campo claro (1000× – DOTT e FOSTER, 1972). O teste hiposmótico foi realizado para avaliar a funcionalidade da membrana celular, utilizando-se uma alíquota de 5 µL de sêmen em 45 µL de solução a 50 mOsm/L (SANTOS et al., 2011). Para determinar a concentração espermática, uma alíquota de 10 µL de sêmen foi diluída em solução formolizada (10%) tamponada (1 mL) e observada em câmara de Neubauer.

Cada amostra foi dividida em quatro alíquotas, sendo duas imediatamente diluídas em Tris [3.028 g Tris-hidroximetil-aminometano, 1,78 g ácido cítrico mono-hidratado, e 1,25 g D-frutose, dissolvidos em 100 mL de água ultrapura] ou água de coco em pó (ACP-119[®]), preparada de acordo com as recomendações do fabricante (ACP Biotecnologia – ACPBIOTEC, Fortaleza, CE). As outras duas alíquotas foram centrifugadas a 800 g/10 min (WESTENDORF et al. 1975) para a retirada do plasma seminal, e depois diluídas nas mesmas substâncias. O volume de diluente foi calculado a fim de que fosse atingida a concentração final de 15×10^6 espermatozoides/mL. Todas as amostras foram incubadas em banho-maria a 34 °C, temperatura corpórea do tatu-peba, para realização de um teste de termorresistência (TTR – SANTOS et al., 2011). Neste teste, procederam-se as análises seminais a cada 60 min ao longo de 3 h.

Os resultados foram expressos em média e erro padrão (média ± EP) e analisados pelo programa StatView[®] 5.0 para Windows (Cary, NY, USA). Com exceção dos dados de vigor, os demais resultados foram checados quanto à homocedasticidade pelo teste de Levene, e submetidos à transformação em Arco Seno. O efeito dos tratamentos sobre os diferentes parâmetros seminais foi comparado pelo teste de Fisher PLSD. As comparações ao longo do

tempo foram realizadas pela ANOVA para medidas repetidas ($P < 0,05$). A ação dos mesmos efeitos sobre o vigor foi verificada pelo teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$).

2.5 RESULTADOS

O sêmen fresco dos tatus-peba apresentou coloração branca e aspecto translúcido, pH alcalino próximo 9, e elevada viscosidade. Os ejaculados apresentaram volume de $0,7 \pm 0,5$ mL com concentração de $225,8 \pm 161,9 \times 10^6$ espermatozoides/mL. Foram observados $82,5 \pm 2,6$ % de espermatozoides com morfologia normal. Destes, $77,1 \pm 4,4$ % apresentavam motilidade com vigor $2,1 \pm 0,3$, bem como $71,2 \pm 2,6$ % de membranas estruturalmente íntegras ao esfregaço corado com azul de bromo-fenol, sendo que $62,6 \pm 4,6$ % apresentaram integridade funcional ao teste hiposmótico.

O procedimento de diluição, independente do uso da centrifugação, promoveu de imediato uma redução na viscosidade seminal. Entretanto, foi observado o fenômeno de “rouleaux” espermático, apresentando-se na forma de dois ou mais espermatozoides agregados cabeça-cabeça. Essa disposição persistiu, mas em menor proporção, mesmo após a diluição em ambos os diluentes testados, e no decorrer de todo o experimento.

Ao TTR, observou-se declínio ($P < 0,05$) da motilidade e do vigor espermático (Figura 1AB) já aos 60 min após a diluição em ambos tratamentos, sendo mais pronunciado no uso do ACP-119[®] ($P < 0,05$). Este declínio se acentuou ao longo dos 180 min, juntamente com um declínio nos valores referentes à integridade estrutural (Figura 2A) e funcional da membrana (Figura 2B). Aos 180 min, nas amostras não centrifugadas, foram verificados valores em torno de 20% de espermatozoides com membranas íntegras do ponto de vista estrutural e funcional, embora os mesmos estivessem imóveis.

De modo geral, evidenciou-se efeito negativo da centrifugação ($P < 0,05$) sobre os parâmetros seminais, ao longo do TTR, no uso de ambos os diluentes (Figuras 1 e 2). A morfologia espermática foi também avaliada no experimento, porém, não foram observados danos significativos sobre este parâmetro e, aos 180 min, valores próximos a 80% de espermatozoides com morfologia normal foram observados em todos os tratamentos.

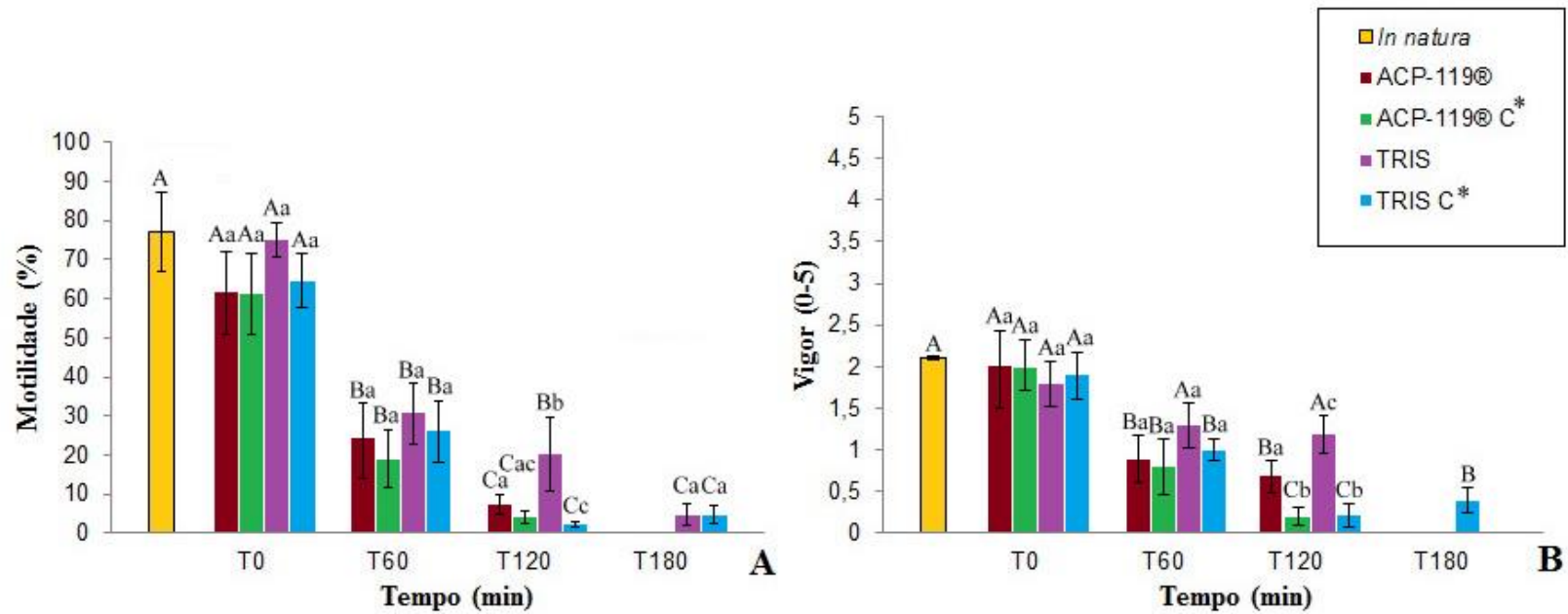


Figura 9 – Valores (média $\pm$ dp) referentes à motilidade (A), e vigor (B) em sêmen de tatus-peba (*Euphractus sexcinctus* – n = 12 ejaculados derivados de 04 indivíduos) durante teste de termorresistência com diluentes Tris e ACP-119® associados ou não à centrifugação (C*).

^{abc}Sobrescritos com letras minúsculas diferentes indicam valores com diferença significativa entre os grupos experimentais dentro de cada tempo ($P < 0,05$). ^{ABCD}Sobrescritos com letras maiúsculas diferentes indicam valores com diferença significativa dentro do mesmo grupo experimental ao longo do tempo ($P < 0,05$).

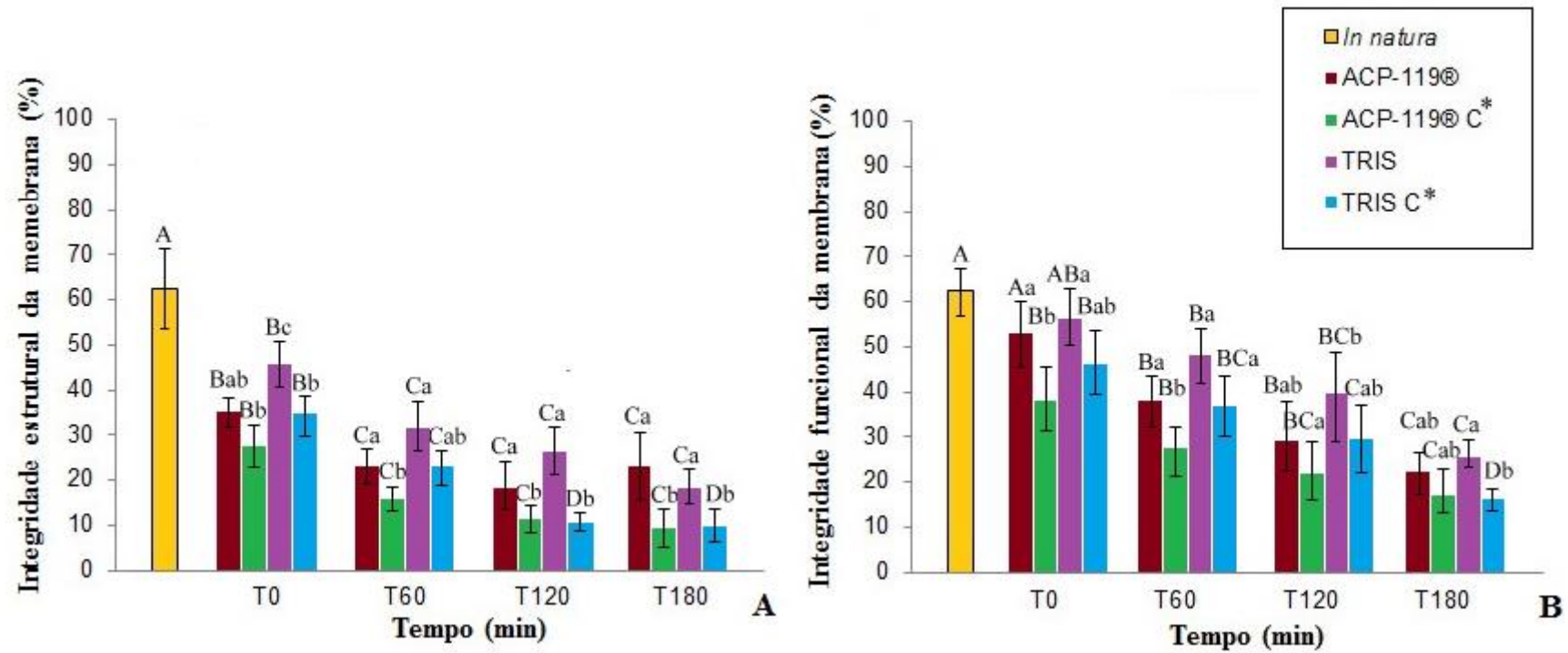


Figura 10 - Valores (média $\pm$ dp) referentes à integridade estrutural de membrana determinada com azul de bromofenol (A) e integridade funcional de membrana determinada pelo teste hiposmótico (B) em sêmen de tatus-peba (*Euphractus sexcinctus* – n = 12 ejaculados derivados de 04 indivíduos) durante teste de termorresistência com diluentes Tris e ACP-119® associados ou não à centrifugação (C*).

^{abc}Sobrescritos com letras minúsculas diferentes indicam valores com diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos experimentais dentro de cada tempo. ^{ABCD}Sobrescritos com letras maiúsculas diferentes indicam valores com diferença significativa ($P < 0,05$) de cada grupo experimental ao longo do tempo.

2.6 DISCUSSÃO

Nos tatus-peba, a aplicação de técnicas para a preservação de sêmen encontra desafios relacionados a características inerentes à espécie, como a configuração de aglutinados espermáticos na forma de *rouleaux* e a alta viscosidade do plasma seminal, que associadamente, contribuem para a redução fisiológica do movimento espermático progressivo (SANTOS et al., 2011), como relatado para o tatu *Cabassous unicinctus* (HEATH et al., 1987). Não se sabe ao certo a razão desta elevada viscosidade observada nas amostras de sêmen. Em camelos, há relatos de que seja relacionada à grande presença de glicosaminoglicanos no plasma seminal (MOSAFERI et al., 2005), proveniente de secreções da próstata ou glândulas vesiculares (CARDOSO et al., 1985). Esta característica, além de prejudicar a avaliação da qualidade do sêmen, não permite que o mesmo se misture adequadamente aos diluentes (OLIVEIRA et al., 2011; WANI et al., 2008).

Nos presente estudo, ambos os diluentes foram eficientes em promover uma imediata redução de viscosidade no plasma seminal de tatus-peba. De fato, tanto o diluente à base de Tris quanto aquele à base de ACP-119[®] já haviam sido reportados por liquefazer o coágulo seminal em camélídeos (WANI et al., 2008) e primatas (OLIVEIRA et al., 2011), respectivamente. No entanto, apesar da redução da viscosidade, a diluição não foi suficiente para impulsionar progressão aos espermatozoides devido a persistência dos *roleaux* entre os espermatozoides de tatus-peba. Essas formações foram descritas em outra espécie de tatu (*C. unicinctus*), através de imagens por ultramicroscopia, mostrando dois ou mais espermatozoides empilhados, sendo atribuídas ao formato côncavo da cabeça dos espermatozoides, o que facilita o encaixe e a permanência da junção entre essas células (HEATH et al., 1987). Este fenômeno é também descrito em marsupiais (*Didelphis virginiana*), nos quais acredita-se que este evento coesivo favoreça a proteção dos espermatozoides durante sua passagem pelo epidídimo, sendo que sua separação deva ocorrer apenas no trato genital feminino (RODGER e BEDFORD, 1982). Diante deste conceito fisiológico, é possível que os estudos voltados para a tecnologia de sêmen em tatus devam ser focados no desenvolvimento de métodos que permitam a preservação das células mesmo estando elas agregadas, possibilitando a manutenção de sua viabilidade e posterior separação quando inseridas no trato genital feminino durante a inseminação artificial.

No teste de termorresistência com ambos os diluentes, verificou-se um rápido declínio da motilidade espermática. Porém, de modo geral, o diluente Tris permitiu uma

melhor conservação que o ACP® nas avaliações realizadas aos 60 e 120 min. Esta melhor atuação do Tris pode ser atribuída a sua capacidade em reduzir o metabolismo da frutose pela célula, contribuindo para a preservação de sua energia (RODRIGUES, 1997). Por outro lado, a presença de citocininas, como a cinetina, na água de coco, tende, inicialmente, a aumentar o metabolismo das células (LEE et al., 2006), induzindo a depleção de ATP (CABELLO et al., 2009), quando em temperaturas elevadas, proporcionando uma mais rápida redução na motilidade espermática. Fato este que não ocorre quando o referido diluente é utilizado na preservação de células espermáticas a baixas temperaturas, conforme inclusive já demonstrado em tatus-peba (AMORIM et al., 2012).

Ao longo do TTR, não foram evidenciados danos significativos à morfologia espermática em decorrência da centrifugação. Sabe-se que a ocorrência de danos mecânicos estaria relacionada à sensibilidade característica de cada espécie, de modo que os espermatozoides de tatus-peba parecem, em parte, ser resistentes a este procedimento, conforme descrito para equinos (CROCKETTA et al., 2001) e bovinos (PICKETT et al., 1975). Entretanto, não se pode descartar a ocorrência de danos subletais ao nível manométrico, haja vista ter sido verificado um efeito deletério da centrifugação sobre a motilidade, vigor e integridade de membrana nos tatus-peba, em ambos os diluentes testados. Nos caprinos, resultados similares têm sido atribuídos a danos ultraestruturais, apenas visualizados sob microscopia eletrônica, causados pela centrifugação, e podendo ocasionar redução da viabilidade e, conseqüentemente, perda da fertilidade (VIANA et al., 2006).

O uso de corantes supravitais detecta a integridade física da membrana plasmática, enquanto o teste hiposmótico avalia se ela está bioquimicamente ativa (ARRUDA et al., 2011). Assim, através do teste hiposmótico, verificou-se que o Tris promoveu uma melhor conservação do percentual de espermatozoides com membrana bioquimicamente ativa no sêmen de tatus-peba. Apesar do ACP® ser rico em proteínas, sais, açúcares, entre outras substâncias (BARROS e TONIOLLI, 2011), é possível que o Tris possua uma concentração de eletrólitos mais adequada para manter por um período maior a pressão osmótica fisiológica do sêmen de tatus-peba. Necessário também salientar que os gametas de diferentes espécies respondem de modo diferenciado aos meios aos quais são expostos (PURDY, 2006). Muitas vezes, a razão desta variação é inerente à composição bioquímica de sua membrana plasmática ou a componentes intracelulares que permanecem por serem melhor estudados (HOLT, 2000).

De modo geral, na comparação dos diluentes, observou-se uma melhor eficiência do Tris quanto a preservação dos parâmetros seminais ao longo do TTR, principalmente até os 120 min de avaliação. Após este período, os dois diluentes se equipararam. Diante disso, recomenda-se o uso do Tris como diluente mais apropriado para a preservação do sêmen de tatus-peba a 34 °C por curtos períodos de até 120 min. Em adição, não se recomenda a centrifugação das amostras previamente à diluição, haja vista o efeito negativo que esta exerce sobre a viabilidade seminal.

2.7 COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Os procedimentos foram realizados de acordo com as normas internacionais de bem estar animal e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFERSA, recebendo parecer nº 21/2011, referente ao processo 23091.002754/2011-99.

2.8 REFERÊNCIAS

ALVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; ALVAREZ, M.; BORRAGAN, S.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; HOLT, W. V.; FAZELI, A.; DE PAZ, P.; ANEL, L. The addition of heat shock protein HSPA8 to cryoprotective media improves the survival of brown bear (*Ursus arctus*) spermatozoa during chilling and after cryopreservation. **Theriogenology**, v.79, p.541-50, 2013.

AMORIM, R.N.L.; SOUSA, P.C.; CASTELO, T.S.; SANTOS, E.A.A.; SILVA, A.R. Características do sêmen de tatus-peba (*Euphractus sexcinctus* Linnaeus, 1758) coletados por eletroejaculação utilizando diferentes protocolos anestésicos. In: XVII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFERSA, 2011, Mossoró, RN. **Anais...**Mossoró: UFERSA, 2011. p. 47.

AMORIM, R.N.L.; EMERENCIANO, K.D.M.; SOUSA, P.C.; CASTELO, T.S.; LIMA, G.L.; SILVA, A.R.. Short-term preservation at 5°C of Armadillo's (*Euphractus sexcinctus*) semen.

In: III INTERNATIONAL SYMPOSIUM ANIMAL BIOLOGY OF REPRODUCTION, ISABR, 2012, Campinas, SP. **Anais...** Campinas: ISABR, 2012. p. 971.

ANACLETO, T.C.S.; GODOY, L.P.; TUBELIS, D.P. Estimating potential geographic ranges of armadillos (*Xenarthra*, *Dasypodidae*) in Brazil under niche-based models. **Mammalia**, v.70, p.202-213, 2006.

ARRUDA, R.P.; SILVA, D.F.; AFFONSO, F.J.; LEMES, K.M.; JAIMES, J.D.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F., OLIVEIRA, L.Z.; NASCIMENTO, J. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 35, n. 2, p. 145-151, 2011.

BARROS, T. B.; TONIOLLI, R. Uso potencial da água de coco na tecnologia de sêmen. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 35, n. 4, p. 400-407, 2011.

CABELLO, C.M.; BAIR, W.B. 3RD; LEY, S.; LAMORE, S.D.; AZIMIAN, S.; WONDRAK, G.T. The experimental chemotherapeutic N6-furfuryladenine (kinetin-riboside) induces rapid ATP depletion, genotoxic stress, and CDKN1A (p21) up regulation in human cancer cell lines. **Biochem. Pharmacol.**, v. 77, p. 1125–1138, 2009.

CARDOSO, F.M.; FIGUEIREDO, E.L.; GODINHO, H.P.; CÓSER, A.M. Variação sazonal da atividade secretória das glândulas genitais acessórias masculinas de tatus *Dasypus Novemcinctus* Linnaeus, 1758. **Rev. Bras. Biol.**, v. 45, n. 4, p. 507-514, 1985.

CASTELO T.S.; BEZERRA F.S.B.; LIMA G.L.; ALVES H.M.; OLIVEIRA I.R.S.; SANTOS E.A.A.; PEIXOTO G.C.X.; SILVA A.R. Effect of centrifugation and sugar supplementation on the sêmen cryopreservation of captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*). **Cryobiology**, v.61, p.275-279, 2010.

CROCKETTA E.C.; GRAHAMA J.K.; BRUEMMERB J.E.; SQUIRESA E.L. **Effect of** cooling equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility: preliminary results. **Theriogenology**, v. 57, p. 793-803, 2001.

HEATH, E.; SCHAEFFER, N.; MERITT DA, J.R.; JEYENDRAN, R.S. Rouleaux formation by spermatozoa in the naked-tail armadillo, *Cabassous unicinctus*. **J. Reprod. Fertil.**, v.79, p.153-158, 1987.

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

IUCN. **Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN**, Versão Online. Disponível em: < <http://www.iucnredlist.org/search/details.php/8306/all> > Acesso: 5 jan. 2013.

LEE, H.S.; MADHAIYAN, M.; KIM, C.W., CHOI, S.J.; CHUNG, K.Y.; SA, T.M. Physiological enhancement of early growth of rice seedlings (*Oryza sativa* L.) by production of phytohormone of N₂-fixing methyolotrophic isolates. **Biol. Fertil. Soils**, v.42, p. 402-408, 2006.

MOSAFERI, S.; NIASARI-NASLAJI, A.; ABARGHANI, A.; GHARAH DAGHI, A.A.; GERAMI, A. Biophysical and biochemical characteristics of Bactrian camel semen collected by artificial vagina. **Theriogenology**, v.63, p.92–101, 2005.

OLIVEIRA, K.G.; MIRANDA, S.A.; LEÃO, D.L.; BRITO, A.B.; SANTOS, R.R.; DOMINGUES, S.F. Semen coagulum liquefaction, sperm activation and cryopreservation of capuchin monkey (*Cebus apella*) semen in coconut water solution (CWS) and TES–TRIS. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 123, p. 75–80, 2011.

PICKETT, B.W.; SULLIVAN, J.J.; BYERS, W.W.; PACE, M.M.; REMMENG, E.E. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. **Fertil. Steril.**, v. 26, p. 167-174, 1975.

PURDY, P. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v.63, p.215-225, 2006.

RODGER, J.C.; BEDFORD, J.M. Separation of sperm pairs and sperm-egg interaction in the opossum *Didelphis virginiana*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.64, p.171-179, 1982.

RODRIGUES, B.A. **Efeito do diluidor à base de albumina sérica bovina (BSA) sobre a viabilidade in vitro do sêmen canino criopreservado**, 1997. 176p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.

SANTOS, E.A.A.; SOUSA, P.C.; DIAS, C.E.; CASTELO, T.S.; PEIXOTO, G.C.; LIMA, G.L.; RICARTE, A.R.; SIMÃO, B.R.; FREITAS, C.I.; SILVA, A.R. Assessment of sperm survival and functional membrane integrity of the six-banded armadillo (*Euphractus sexcinctus*). **Theriogenology**, v. 76, p. 623-629, 2011.

SERAFIM, M. K. B.; LIRA, R. A.; COSTA, L. L. M.; GADELHA, I. C. N.; FREITAS, C. I. A.; SILVA, A. R. Description of semen characteristics from six-banded armadillos (*Euphractus sexcinctus*) collected by electroejaculation. **Animal Reproduction Science**, v.118, p. 362-365, 2010.

SOUSA, P.C.; SANTOS, E.A.; BEZERRA, J.A.; LIMA, G.L.; CASTELO, T.S.; FONTENELE-NETO, J.D.; SILVA, A.R. Morphology, morphometry and ultrastructure of captive six-banded armadillo (*Euphractus sexcinctus*) sperm. **Animal Reproduction Science**, v.140, p.279-285, 2013.

VIANA, A. K. S.; CHALHOUB, M.; RIBEIRO FILHO, A. L.; ALMEIDA, A. K.; PORTELA, A. P. M.; BITTENCOURT, R. F.; ALVES, S. G. G.; BITTENCOURT, T. C. C.; QUINTELA, A. T. Avaliação in vitro do sêmen caprino resfriado, com ou sem centrifugação do plasma seminal e diluído em desnatado-glicose e tris-gema de ovo. **Ci. Anim. Bras.**, v. 7, n. 1, p. 67-76, 2006.

WANI, N.A.; BILLAH, M.; SKIDMORE, J.A. Studies on liquefaction and storage of ejaculated dromedary camel (*Camelus dromedarius*) semen. **Ani. Reprod. Sci.**, v. 109, p. 309–318, 2008.

WESTENDORF, P.; RITCHER, L; TREU, H. Tiefgefrierung von Ebersperma. Labor- und Besamungsergebnisse mit dem Hülseberger Paillettenverfahren. **Dtsch Tierärztl Wschr.**, v. 82, p. 261–267, 1975.

**3 CAPÍTULO 3 – PRIMEIRA TENTATIVA DE CRIOPRESERVAÇÃO DO
SÊMEN DE TATUS-PEBA (*Euphractus sexcinctus*): ESTUDO DAS CRIOINJÚRIAS
ESPERMÁTICAS**

**First attempt on the cryopreservation of six-banded armadillo (*Euphractus sexcinctus*)
semen: study on the sperm cryoinjuries**

P. C. Sousa, E. A. A. dos Santos, J.A.B. Bezerra, A. L. P. Souza, G. L. Lima, A. R. Silva

A ser submetido à revista Cryobiology

PRIMEIRA TENTATIVA DE CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE TATUS-PEBA (*Euphractus sexcinctus*): ESTUDO DAS CRIOINJÚRIAS ESPERMÁTICAS

3.1 RESUMO

O objetivo deste estudo foi criopreservar o sêmen de tatus-peba (*E. sexcinctus*) em diluente Tris-gema e glicerol, e determinar os danos causados pela congelação-descongelação, através da utilização de marcadores fluorescentes e análise ultraestrutural. As amostras de sêmen (n = 12), oriundas de 04 animais adultos, foram coletadas por eletroejaculação, e depois criopreservadas em diluente Tris acrescido de 20% de gema de ovo e 3% de glicerol, em curva rápida de congelação. A análise dos parâmetros básicos das amostras foi realizada após a diluição, refrigeração e descongelação, seguida da análise de fluorescência, utilizando a combinação de sondas fluorescentes para avaliar a integridade da membrana plasmática (Iodeto de Propídio - IP e Hoechst - H-342), e a atividade mitocondrial (CMXRos - Mito Tracker red[®]). Utilizou-se também a análise ultraestrutural para verificar possíveis alterações morfológicas causadas por crio-injúrias. A maioria das alterações observadas em todos os estágios da criopreservação do sêmen de tatus-peba foi secundária, mas as proporções desses defeitos aumentaram significativamente a partir da etapa de refrigeração, sendo maior após a descongelação, devido ao choque térmico e estresse osmótico. Porém, em sêmen descongelado, os resultados da análise por fluorescência indicaram um percentual de células com a membrana plasmática intacta maior (8,4 %) do que o de células móveis (6,1 %). Isto pode ser devido à ação da gema de ovo, em permitir maior integridade estrutural a algumas células. As imagens obtidas por eletromicroscopia de transmissão demonstraram, em espermatozoides criopreservados, danos às membrana plasmática e mitocondriais, como também modificações nucleares e acrossomal caracterizadas por alterações da cromatina e capacitação espermática, respectivamente. Em conclusão, este estudo é o primeiro relato sobre a utilização da criopreservação em sêmen de xenartras, e os resultados aqui obtidos são fundamentais para promover a melhoria do protocolo de criopreservação de sêmen de tatus-peba, que pode ser expandindo para outras espécies de tatus ameaçadas ou vulneráveis à extinção.

Palavras-chave: tatu-peba, criopreservação, sêmen, integridade da membrana, atividade mitocondrial, ultraestrutura.

3.2 ABSTRACT

The aim of this study was to cryopreserve by, first, the semen of six-banded armadillos (*Euphractus sexcinctus*) in diluent Tris-yolk and glycerol, and determine the damage caused by freeze-thaw, through the use of fluorescent markers and ultrastructural analysis. Semen samples (n = 12) collected from 04 adult animals were collected by electroejaculation, and then cryopreserved in Tris diluent plus 20% egg yolk and 3% glycerol, cornering fast freezing. Classical analysis of samples was performed after dilution, cooling and thawing, followed by fluorescence analysis, using a combination of fluorescent probes for assessing membrane integrity (propidium iodide - PI and Hoechst - H-342), and the activity mitochondrial (CMXRos - Mito Tracker red[®]). Were also used for the ultrastructural analysis to verify possible morphological changes caused by crioinjúrias. Most of the changes observed in all stages of cryopreservation of semen from six-banded armadillos was secondary, but the proportions of these defects increased significantly from step cooling, after thawing was higher due to heat shock and osmotic stress. However, in thawed, the results of fluorescence analysis indicated a percentage of cells with intact plasma membrane higher (8.4%) than that of motile cells (6.1%). This may be due to the action of egg yolk, to provide greater structural integrity to some cells. The images obtained by transmission electron microscopy demonstrated in cryopreserved sperm, damage to the plasma membrane and mitochondrial changes as well as nuclear and acrosomal characterized by changes in chromatin and sperm capacitation, respectively. In conclusion, this study is the first report on the use of cryopreservation on semen xenartras, and the results obtained here are fundamental to promote the improvement of the protocol for cryopreservation of semen from six-banded armadillos, which can be expanded to other species of armadillos endangered or vulnerable to extinction.

Key-words: armadillo, cryopreservation, semen, membrane integrity, mitochondrial activity, ultrastructure

3.3. INTRODUÇÃO

Das 38 espécies de mamíferos pertencentes à ordem Xenarthra, pelo menos nove estão vulneráveis ou em perigo de extinção, como os tatus do gênero *Tolypeutes* e o tatu canastra (*Priodontes maximus*) (IUCN, 2013). Contudo, o tatu-peba (*E. sexcinctus*), membro da família Dasipodidae, tem sido classificado como uma espécie de população estável e não ameaçada (IUCN, 2013), podendo ser utilizado como modelo experimental ideal para desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas em outras espécies ameaçadas do mesmo grupo. Porém, estudos relacionados à fisiologia e biotecnologia da reprodução em tatus e demais exemplares da ordem Xenarthra ainda são escassos, estando limitados à caracterização e à análise clássica do sêmen *in natura* (HEATH et al., 1987; PERES et al., 2008; MENDONÇA, 2010; SERAFIM et al., 2010; SANTOS et al., 2011).

A criopreservação de sêmen surge como uma ação estratégica de grande relevância para a reprodução e manutenção da diversidade genética da fauna silvestre, além de proporcionar a reserva genética em longo prazo em bancos de germoplasma animal, atualmente integrante em muitos programas de conservação de animais silvestres, inclusive para espécies ameaçadas de extinção (PUKAZHENTHI et al., 2006). Este processo se dá a partir da preservação dos espermatozoides em meios diluidores contendo sistema tampão, substrato energético, fosfolipídios e crioprotetores em concentrações adequadas para manter a qualidade e a capacidade fertilizante dessas células por longos períodos (HOE et al., 2001). Entretanto, a criopreservação pode causar sérios danos às células espermáticas pela influência de vários fatores, como as bruscas mudanças de temperatura, a ocorrência de tensões osmóticas, a toxicidade devida à exposição aos crioprotetores e, a formação de cristais de gelo no ambiente intra e extracelular (MEDEIROS et al., 2002).

Para determinar e identificar essas crioinjúrias, diferentes técnicas de avaliação do sêmen são utilizadas. Convencionalmente, são empregados os testes de motilidade e de morfologia como análises rápidas para amostras de sêmen, porém estes não evidenciam alterações onde os defeitos morfológicos são expressos em escalas nanométricas (CRESPILHO et al., 2006), as quais são alcançadas pela microscopia eletrônica. Mesmo com os avanços dessa técnica, há uma carência de informações sobre os danos induzidos pela criopreservação na ultraestrutura espermática, e a maioria delas é voltada para animais domésticos (SILVA et al., 2009). No que diz respeito aos animais silvestres, esses estudos são ainda mais raros (SA-ADRIT et al., 2006).

Embora os danos na morfologia dos espermatozoides sejam os mais evidentes durante a criopreservação seminal, o estresse físico para as membranas espermáticas é visto como o maior fator limitante (PESCH e BERGMAN, 2006). Com base nesse aspecto, uma grande ênfase vem sendo dada ao uso dos marcadores fluorescentes, que evidenciam estruturas específicas das células e detectam de forma clara a integridade estrutural e funcional de espermatozoides (SA-ADRIT et al., 2005; CELEGHINI et al., 2007; STOOPS et al., 2010).

Dada a importância da criopreservação de sêmen para a conservação de espécies silvestres, este trabalho representa um primeiro passo no sentido de se implementar um banco de germoplasma voltado para a preservação de material genético oriundo de xenartras. Desse modo, objetivou-se criopreservar, pela primeira vez, o sêmen de tatus-peba (*E. sexcinctus*), em diluidor a base de Tris-gema e glicerol, e determinar as principais crio-injúrias através da utilização de marcadores fluorescentes e análise ultraestrutural.

3.4 MATERIAL E MÉTODO

3.4.1 Animais

Os procedimentos foram realizados de acordo com as normas internacionais de bem estar animal e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFERSA, recebendo parecer nº 21/2011, referente ao processo 23091.002754/2011-99. O estudo foi conduzido com animais provenientes do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres – CEMAS da UFERSA, registrado no IBAMA como criatório científico sob o número 1478912, situado na cidade de Mossoró, localizada na região semiárida brasileira (5°10'S-37°10'W; intervalo médio de temperatura, 27-29°C). Foram utilizados quatro tatus-peba machos adultos, pesando aproximadamente $3,25 \pm 0,2$ Kg. Os animais eram considerados adultos, mas sua idade exata era desconhecida, haja vista que encontravam-se em cativeiro há pouco mais de um ano previamente ao início do experimento. Os animais foram confinados em gaiolas individuais mantidos sob fotoperíodo natural, alimentados uma vez por dia com ração para cães acrescida de vegetais, e acesso *ad libitum* à água.

3.4.2 Contenção dos animais

Por ocasião de cada procedimento, os animais foram contidos mecanicamente com o auxílio de luvas apropriadas. Procedeu-se uma medicação pré-anestésica utilizando-se xilazina (1mg/kg (Sedomin[®], König S.A., Buenos Aires, Argentina) e cetamina - 7mg/kg (Quetamina Injetável, Vetnil[®], São Paulo, Brasil) por via intramuscular, seguida da manutenção do estado anestésico por meio da aplicação intravenosa de propofol - 5mg/kg (Propovan[®], Cristalia, Fortaleza, Brasil) em bolus (AMORIM et al. 2011). Os animais foram posicionados em decúbito dorsal, realizando-se a higienização das regiões peniana e perianal com solução fisiológica.

3.4.3 Coleta de sêmen

Cada animal foi submetido a quatro procedimentos de eletroejaculação em intervalos de 15 a 21 dias entre as coletas. Para a eletroejaculação, procedeu-se a metodologia proposta por SERAFIM et al. (2010), que consiste no uso de um eletroejaculador (Eletrojet[®], Eletrovét, São Paulo, SP, Brasil), conectado a uma fonte de 12 V. Foram realizados três ciclos sucessivos de estimulação, com 5 min de intervalo entre ciclos. O primeiro ciclo consistiu de 10 estímulos de 2, 3, e 4 miliamperes (mA), o segundo foi de 10 estímulos de 3, 4 e 5 mA, e o terceiro foi de 10 estímulos de 5 e 6 mA. A sonda do eletroejaculador mede 12,5cm (comprimento) e 1,0 cm (de diâmetro), apresentando dois eletrodos longitudinais. Cerca de 8 cm da sonda foi inserida na cavidade retal de cada animal. O sêmen foi colhido em tubos plásticos e imediatamente avaliado.

3.4.4 Avaliação clássica do sêmen

Foram verificados, no tubo de coleta, o aspecto e a coloração do ejaculado. O pH foi mensurado utilizando-se fitas apropriadas (Neutralit[®] Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). O volume foi aferido com o uso de micropipetas (5 a 100µL). A motilidade espermática (percentual de espermatozoides móveis) e o vigor (qualidade do batimento flagelar numa

escala de 0-5) foram imediatamente avaliados em microscópio de luz (Eclipse E200, Nikon, Melville, NY, USA) sob aumento de 100× e 400×. Para a análise morfológica dos espermatozoides, foram confeccionados esfregaços de sêmen corados com Rosa de Bengala (Sigma, Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil), sendo observadas duzentas células/lâmina sob microscopia de luz em aumento de 1000× (DOTT et al. 1972). O teste hiposmótico foi realizado para avaliar a funcionalidade membrana celular espermática logo após a coleta de sêmen, utilizando uma alíquota de 5 µL de sêmen em 45 µL de água destilada (50mOsm/l) (SANTOS et al. 2011). Para determinar a concentração espermática, uma alíquota de 10 µL de sêmen foi diluída em solução formolizada (10%) tamponada (1mL) e observada em câmara hematómica (câmara de Neubauer).

3.4.5 Criopreservação dos espermatozoides

Cada amostra de sêmen *in natura* foi diluída em Tris [3.028g Tris-hidroximetilaminometano 1,78 g ácido cítrico monohidratado, e 1,25g D-frutose (todas as substâncias provenientes da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) adicionado de gema (20 %) glicerol (3 %) (adaptado de SILVA et al., 2012). As amostras foram então resfriadas até 15 °C por 40 min, e depois por mais 30 min até 4 °C. Nesse momento, foi realizada a glicerolização (6 %) e o envase em palhetas de 0,25 mL, atingindo-se uma concentração final de 15×10^6 espermatozoides por mL. Fez-se a criopreservação em vapor do nitrogênio, e o acondicionamento em botijão criobiológico. Após uma semana, foi realizada a descongelação das amostras as quais foram, primeiramente, submetidas à temperatura ambiente (10 min), em seguida, em banho-maria a 37 °C por 1 min, e avaliadas microscopicamente quanto aos parâmetros gerais de qualidade seminal.

3.4.6 Análise de viabilidade espermática por sondas fluorescentes

Imediatamente após a diluição e a descongelação, uma alíquota de sêmen (10 µL) foi incubada a 34 °C/10 min em uma solução composta pela associação das seguintes sondas fluorescentes: 2 µL IP (Iodeto de propídio, Sigma-Aldrich, Co., St Louis, MO, USA) 0,5 mg/mL NaCl 0,9 %, 5 µL CMXRos (Mito Tracker red[®], Molecular Probes, M-7512) 500 nM

{diluição de 50 µg em 94µL de DPBS}, e 3µL de Hoechst 342 (H342; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) {diluição 25 mg/mL de DMSO}, baseada na metodologia descrita por CELEGHINI et al. (2007). Em seguida, as amostras foram avaliadas em microscópio de epifluorescência (Episcopic Fluorescent attachment “EFA” Halogen Lamp Set, Leica, Kista, Sweden), onde 200 espermatozoides foram contados. Cabeças espermáticas marcadas em azul (H-342) foram consideradas possuidoras de plasmalema intacto e as marcadas total ou parcialmente em vermelho (PI) foram consideradas como não intactas; região da peça intermediária marcada em vermelho foi considerada com função mitocondrial.

3.4.7 Análise ultraestrutural

Foram utilizados dois *pools* compostos por uma amostra de sêmen derivada de cada animal, sendo um *pool* de amostras in natura e outro de descongeladas. Cada uma dos *pools* foi centrifugado a 800 *g* por 10 min, sendo o sobrenadante removido e o precipitado lavado em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,4) sob rápida centrifugação (800 *g*/3 min). Em seguida, as amostras foram fixadas em solução Karnovsky modificada (paraformaldeído 2 % e glutaraldeído 2 % em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4). Após 12 h, essa solução foi removida e as amostras ressuspensas em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M até o processamento, onde este tampão foi removido e as amostras submetidas à fixação com tetróxido de ósmio a 2 % em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M (pH 7,4) por 2 h. Depois, as amostras foram submetidas à solução de acetato de uranila 9,5 % adicionada de sacarose a 10,56 %, *overnight*. As amostras sofreram desidratação através de banhos em concentrações crescentes de álcool 70 %, 95 % e 100 % e depois mantidas em solução de oxipropileno e resina Spurr (1:1) por 8 h. Após este período, as amostras sofreram tratamento em resina pura (37 °C) – *overnight* – sendo realizada a inclusão. Depois de 48 h, foram feitos cortes semifinos (400 nm) corados com azul de toluidina e analisados em lupa. Depois, foram realizados cortes ultrafinos (70 nm) contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e analisados no microscópio eletrônico de transmissão (Morgagni 268 D, FEI Company, Transmission Electron Microscope), com aceleração de voltagem a 80 Kv (SOUSA et al. 2013).

3.4.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos na forma de Média $\pm$ Erro padrão (EP) e analisados utilizando-se o programa StatView[®] 5.0 para Windows. Os dados foram checados quanto a homecedasticidade pelo teste de Levene. Em seguida, foram submetidos à transformação angular em Arco Seno, com exceção dos dados de vigor espermático. Comparações entre os indivíduos, bem como entre as médias encontradas para o sêmen fresco e descongelado no tocante à preservação das características seminais, à exceção do vigor, foram realizadas utilizando-se o teste de Fisher PLSD ($P < 0,05$). Os efeitos do indivíduo e do procedimento de criopreservação sobre o vigor espermático foi verificado pelo teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$).

3.5 RESULTADOS

O sêmen de tatu-peba apresentou coloração branca com aspecto translúcido, apresentando pH alcalino, sempre com valor próximo de 9, e elevada viscosidade. Os ejaculados apresentaram um volume de $0,71 \pm 0,52$ mL com concentração de $225,8 \pm 161,9 \times 10^6$ espermatozoides/mL. Nas análises de sêmen fresco *in natura* foram observados, frequentemente, espermatozoides agregados cabeça-cabeça (formação *rouleaux*), persistindo, mas em menor proporção, mesmo após a diluição. Foi evidenciada uma variação individual entre os animais no tocante às suas características seminais (Tabela 1).

Tabela 1 – Médias ($\pm$ EP) das características do sêmen fresco (*in natura*) de tatus-peba (*E. sexcinctus*) (n=3 ejaculados/animal)

Parâmetros seminais	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Geral
Motilidade (%)	91,6 $\pm$ 1,6 ^a	86,6 $\pm$ 3,3 ^a	81,6 $\pm$ 10,4 ^a	58,3 $\pm$ 4,4 ^b	79,58 $\pm$ 4, ^{24a}
Vigor (0-5)	1,6 $\pm$ 0,3 ^a	1,6 $\pm$ 0,3 ^a	1 $\pm$ 0 ^b	1 $\pm$ 0 ^b	1,3 $\pm$ 0,14 ^a
Concentração (x10⁶espermatozoides/mL)	58,3 $\pm$ 24,5 ^a	160 $\pm$ 36 ^b	173,3 $\pm$ 86,5 ^{ab}	166,6 $\pm$ 100,8 ^{ab}	139,58 $\pm$ 33 ^b
Integridade estrutural da membrana (%)	58,3 $\pm$ 5,2 ^{ab}	52,6 $\pm$ 4,9 ^a	66,3 $\pm$ 3,18 ^b	63,6 $\pm$ 10,7 ^{ab}	60,25 $\pm$ 11,1 ^{ab}
Integridade funcional da membrana (%)	64,5 $\pm$ 6,5 ^{ac}	86 $\pm$ 4,2 ^b	50,3 $\pm$ 10,7 ^{ac}	74,5 $\pm$ 10,5 ^{bc}	64,37 $\pm$ 6,4 ^c
Volume (μL)	183 $\pm$ 72,6 ^{ac}	775 $\pm$ 225 ^b	333 $\pm$ 120,2 ^{cd}	500 $\pm$ 204,3 ^{bd}	410 $\pm$ 86,5 ^d

^{abcd} Médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes (P > 0,05).

A partir da refrigeração (Tabela 2), já se observou uma redução significativa do percentual de espermatozoides móveis, a qual se intensificou após a descongelação ($P < 0,05$). Com relação ao vigor espermático e a integridade funcional de membrana, tais características apenas foram negativamente afetadas à descongelação ($P < 0,05$).

Tabela 2 – Médias ($\pm$ EP) dos parâmetros seminais de tatu-peba (*E. sexcinctus*) a partir das diferentes etapas da criopreservação

Parâmetros seminais	Diluição	Refrigeração	Descongelação
Motilidade (%)	72,3 $\pm$ 6,2 ^a	49,5 $\pm$ 1,4 ^b	6,1 $\pm$ 2,9 ^c
Vigor (0-5)	1,5 $\pm$ 0,2 ^a	1,4 $\pm$ 0,2 ^a	0,5 $\pm$ 0,1 ^b
Integridade estrutural da membrana (%)	61,2 $\pm$ 4,6 ^a	54,8 $\pm$ 7,5 ^a	12,3 $\pm$ 5 ^b
Integridade funcional da membrana (%)	64,3 $\pm$ 6,4 ^a	57,5 $\pm$ 5,6 ^a	14,2 $\pm$ 3,8 ^b

^{abc} Médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes ($P > 0,05$).

A análise da integridade de membrana plasmática e da atividade mitocondrial por fluorescência (Tabela 3) confirmou os danos provocados a estas estruturas pelos procedimentos de criopreservação e descongelação, quando comparados aos valores verificados para o sêmen fresco ($P < 0,05$). A resposta dos espermatozoides de tatus-peba submetidos à associação de marcadores fluorescentes pode ser vista na Figura 10.

Tabela 3 – Médias ($\pm$ EP) da integridade da membrana plasmática e função mitocondrial de espermatozoides de tatus-peba (*E. sexcinctus*), após análise por fluorescência

Parâmetros	Sêmen diluído	Sêmen descongelado
Membrana plasmática íntegra e mitocôndria ativa (%)	30,2 $\pm$ 1,9 ^a	2,1 $\pm$ 1,1 ^b
Membrana plasmática íntegra e mitocôndria inativa (%)	1,1 $\pm$ 0,4 ^a	6,3 $\pm$ 2 ^b
Membrana plasmática lesionada e mitocôndria ativa (%)	0	0
Membrana plasmática lesionada e mitocôndria inativa (%)	69,3 $\pm$ 1,8 ^a	92,1 $\pm$ 1,6 ^b

^{abc} Médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes ($P > 0,05$).

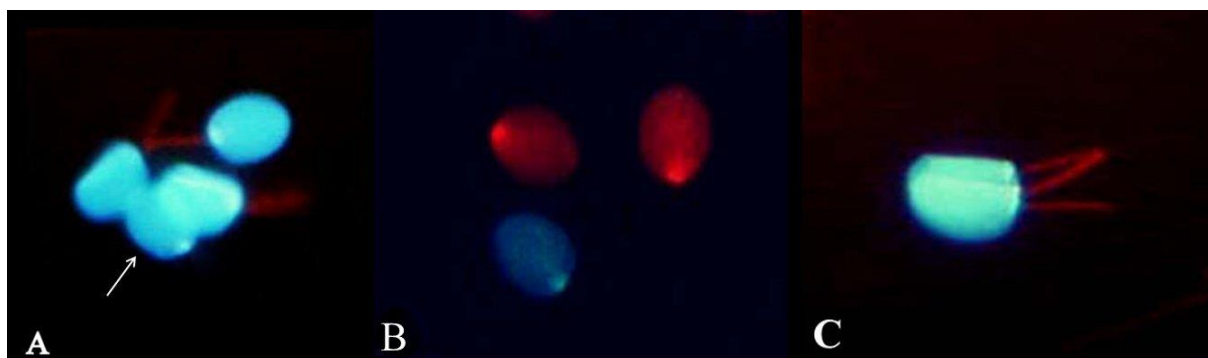


Figura 11 – Integridade de membrana plasmática e atividade mitocondrial de espermatozoides criopreservados de tatus-peba avaliados através da associação dos fluorescentes H3342/IP/ Mito traker red[®]. (A) Espermatozoides marcados em azul com o fluoróforo Hoechst 3342 (H-342) e peça intermediária fluorescente em vermelho, coradas com Mito traker red[®], indicado respectivamente membrana plasmática íntegra e presença de atividade mitocondrial. A seta indica espermatozoide com membrana plasmática íntegra, mas sem atividade mitocondrial. (B) Espermatozoides marcados em vermelho com iodeto de propídio (IP), indicando dano à membrana, e marcados em azul com o H-342, indicando integridade de membrana, porém não apresentam peça intermediária fluorescendo em vermelho pelo Mito Traker red[®], indicando ausência de atividade mitocondrial. (C) Espermatozoides em “rouleaux”, com membranas plasmáticas íntegras e atividade mitocondrial. (Aumento 400×).

Quanto à análise morfológica dos espermatozoides (Tabela 4), foi observado um decréscimo no percentual de células normais a partir da etapa de refrigeração ($P < 0,05$), o qual se acentuou após a descongelção ($P < 0,05$).

Tabela 4 – Médias ($\pm$ EP) das alterações espermáticas de tatu-peba (*E. sexcinctus*) observadas em diferentes etapas da criopreservação

Características (%)	Fresco (<i>in natura</i>)	Diluído	Refrigerado	Descongelado
Morfologia Normal	78.04 $\pm$ 2.8 ^a	77.69 $\pm$ 2.39 ^a	69.43 $\pm$ 2.5 ^b	53.1 $\pm$ 3.8 ^c
Morfologia Anormal	21.96 $\pm$ 2.8 ^a	22.31 $\pm$ 2.39 ^a	30.57 $\pm$ 2.5 ^b	46.9 $\pm$ 3.8 ^c
Cauda				
Enrolada	6.8 $\pm$ 1 ^a	8.08 $\pm$ 1.35 ^a	9.42 $\pm$ 0.98 ^{ac}	12.4 $\pm$ 1.11 ^c
Fort. Enrolada	5 $\pm$ 1.03 ^{ab}	3.75 $\pm$ 0.6 ^a	6.42 $\pm$ 0.83 ^b	8.25 $\pm$ 0.88 ^b
Quebrada	1.42 $\pm$ 0.31 ^a	1.37 $\pm$ 0.42 ^a	1.17 $\pm$ 0.4 ^a	4.15 $\pm$ 1.66 ^b
Colo dobrado/quebrado	1.33 $\pm$ 0.33 ^a	1.41 $\pm$ 0.51 ^a	1.5 $\pm$ 0.54 ^a	1.6 $\pm$ 0.86 ^a
Peça Intermediária				
Dobrada	1.96 $\pm$ 0.38 ^a	1.83 $\pm$ 0.55 ^a	3.75 $\pm$ 1.03 ^a	2.95 $\pm$ 0.86 ^a
Quebrada	0.25 $\pm$ 0.18 ^a	0.42 $\pm$ 0.23 ^a	1.29 $\pm$ 0.67 ^a	2.35 $\pm$ 1.22 ^a
Espessa	0 ^a	0 ^a	0.08 $\pm$ 0.08 ^a	0 ^a
Gota proximal	0	0	0	0
Gota distal	0	0	0	0
Cabeça				
Macrocefalia	0.04 $\pm$ 0.04 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Microcefalia	0.46 $\pm$ 0.33 ^a	0.42 $\pm$ 0.19 ^a	0.25 $\pm$ 0.13 ^a	0.25 $\pm$ 0.13 ^a
Formato anormal	1.58 $\pm$ 0.43 ^a	2 $\pm$ 0.47 ^a	1.45 $\pm$ 0.5 ^a	4.35 $\pm$ 1.08 ^b
Destacada	2.37 $\pm$ 0.92 ^a	2.66 $\pm$ 0.97 ^a	3.37 $\pm$ 0.85 ^a	6.9 $\pm$ 2.39 ^a
Acrossoma anormal	0.75 $\pm$ 0.46 ^{ab}	0.37 $\pm$ 0.2 ^a	1.87 $\pm$ 0.61 ^{bc}	3.7 $\pm$ 1.28 ^c

^{abc} Médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes ($P > 0,05$).

À análise ultraestrutural, verificou-se que os espermatozoides a fresco apresentaram membranas plasmáticas levemente onduladas e membranas acrossomais preservadas e bem delimitadas (Figura 11 - A). Na região da peça intermediária, pode-se observar a bainha mitocondrial com mitocôndrias justapostas, bem preservadas, com as cristas internas imersas numa matriz densa e homogênea (Figura 11 - H e I). Em contraste, os espermatozoides submetidos à criopreservação apresentaram mudanças ultraestruturais caracterizadas por aspecto anormal da cabeça (Figura 11 - E), distensão e ruptura da membrana plasmática (Figura 11 - C e F), presença de formações vesiculares na região adjacente à membrana acrossomal interna (Figura 11 - B e G) e acrossoma capacitado (Figura 11 - C e G). Ainda, entre as amostras de sêmen fresco e descongelado de tatus-peba, foram observadas diferenças

marcantes na região da peça intermediária, principalmente defeitos caracterizados por mitocôndrias anômalas, com aspecto amorfo, cristas mitocondriais desorganizadas, e matriz heterogênea (Figura 11 – I e K). No entanto, salienta-se que, apesar da maior incidência de danos em espermatozoides congelados-descongelados, foram também observados alguns espermatozoides bem preservados nessas amostras.

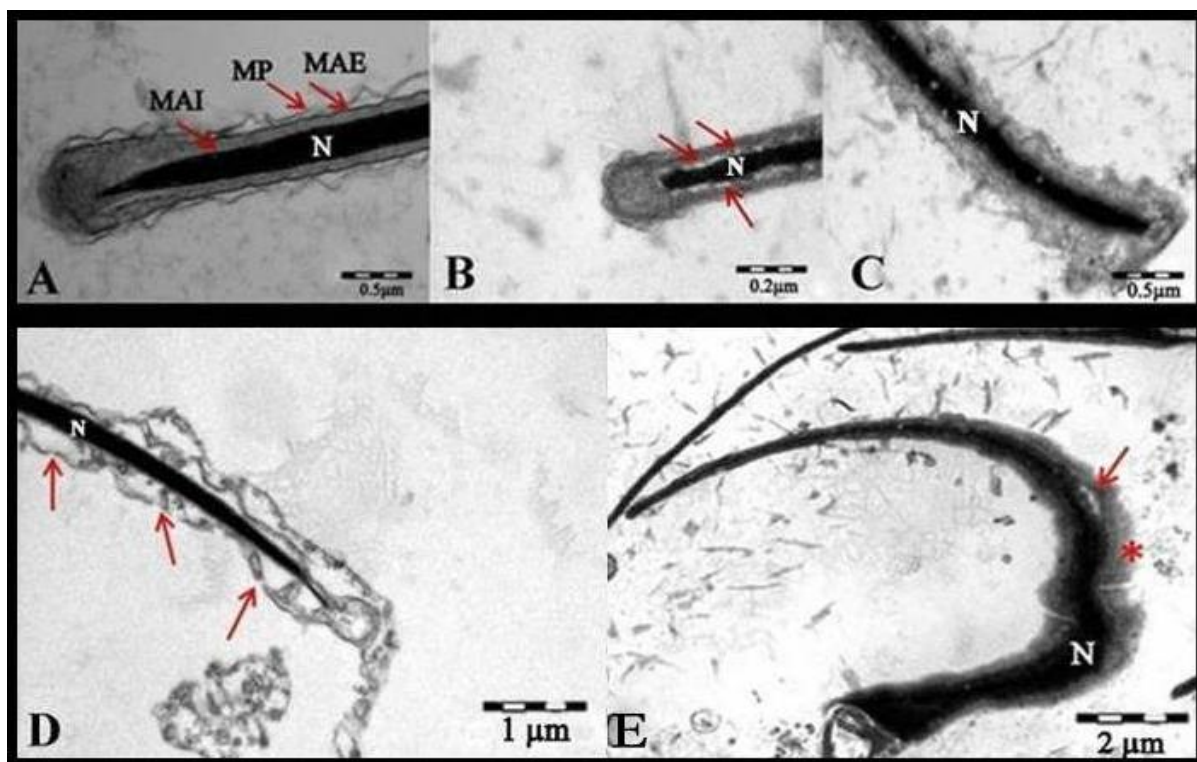


Figura 12 – Micrografias por MET da região da cabeça de espermatozoides obtidas a partir de amostras de sêmen fresco-diluído (grupo controle) e congelados-descongelados de tatus-peba (*E. sexcinctus*). (A) Espermatozoide normal (grupo controle) com membranas plasmática ligeiramente ondulada, com limites bem definidos entre o núcleo e o acrossoma. (B) Espermatozoide apresentando pontos eletrolucos entre o núcleo (N) e a membrana acrossomal interna (setas vermelhas). (C) Acrossomo membranas indefinidas, indicando capacitação. (D) Espermatozoide criopreservado em secção longitudinal, mostrando ruptura e vacuolização da membrana plasmática; (E) deformação da cabeça espermática (formato falciforme), apresentando aparente dano nuclear (seta) adjacente ao acrossomo capacitado.

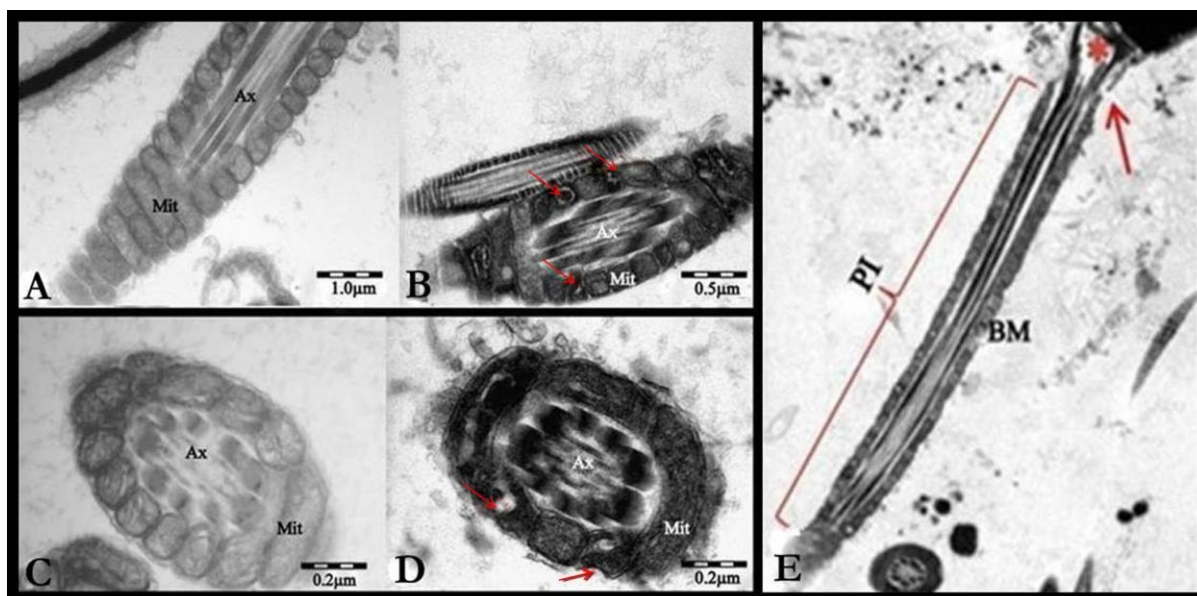


Figura 13 – Micrografias por MET da região da cauda de espermatozoides obtidas a partir de amostras de sêmen fresco-diluído (grupo controle) e congelados-descongelados de tatus-peba (*E. sexcinctus*). (A) Corte tangencial/longitudinal da peça intermediária do espermatozide, mostrando mitocôndrias normais com cristas inseridas em matriz homogênea (grupo controle). (B) Corte tangencial/longitudinal da peça intermediária de espermatozoide congelado-descongelado, contendo mitocôndrias lesionadas com matriz heterogênea (setas). (C) Corte transversal da peça intermediária espermática, mostrando mitocôndrias normais e bem delimitadas (grupo-controle). (D) Corte transversal da peça intermediária espermática, mostrando crioinjúrias às mitocôndrias (setas) (E) bainha mitocondrial (BM) com matriz heterogênea ao longo de toda a peça intermediária (PI), e descontinuidade de membrana (seta) na região do colo (*). (MAI) Membrana acrossomal interna; (MP) Membrana plasmática; (MAE) Membrana acrossomal externa; (N) Núcleo; (PI) Peça intermediária; (BM) Bainha mitocondrial; (Ax) Axonema; (Mit) Mitocôndria.

3.6 DISCUSSÃO

Para facilitar a aplicação de biotécnicas para a conservação de gametas, podem ser tomados como referência protocolos empregados em indivíduos de um mesmo táxon, devido aos animais apresentarem características morfológicas, genéticas e ecológicas semelhantes (HICKMAN JR et al., 2004). Entretanto, não há relatos, até o presente momento, da utilização de técnicas relacionadas à criopreservação seminal em qualquer exemplar Xenartra. Sendo assim, na ausência de espécies próximas submetidas a essa aplicabilidade, a escolha do meio diluidor e dos procedimentos para a criopreservação de espermatozoides de tatus-peba ocorreu de forma empírica, utilizando-se o já estabelecido protocolo para a congelação de espermatozoides em outros mamíferos silvestres, como catetos (*Pecari tajacu*) (SILVA et al., 2013; CASTELO et al., 2010) e cutias (*Dasyprocta aguti*) (SILVA et al., 2011), onde a adição

de glicerol (3 %) e gema de ovo (20 %) ao diluidor base forneceu resultados aceitáveis após a descongelação.

Em tatus-peba, especificamente, nada se sabe sobre a relação dos parâmetros vitais do sêmen e a capacidade de fertilização dos espermatozoides, mas a maioria dos estudos em mamíferos, que testam a aplicação de biotécnicas reprodutivas em machos, usam a motilidade e a integridade da membrana espermática como principais parâmetros para avaliar técnicas de congelamento espermático (SILVA et al., 2009). No presente estudo, foi nítida a queda da qualidade espermática do sêmen congelado-descongelado em comparação aos parâmetros avaliados antes do processo de criopreservação, apresentando diminuição da motilidade espermática (49 %) já a partir da refrigeração a 5 °C, como reportado em sêmen de catetos (*P. tajacu*) (SILVA et al., 2013) e elefantes (*Elephas maximus*) (THONGTIP et al., 2002).

Anteriormente, em tatus-peba (AMORIM et al., 2012), utilizando sêmen diluído em ACP® ou Tris, foi demonstrado que a qualidade espermática é mais afetada durante o armazenamento em baixa temperatura que em animais domésticos, como ovinos (PURDY et al., 2010), os quais apresentaram altos valores para a motilidade espermática mesmo após a exposição das amostras de sêmen a 5 °C por 24 h. É sabido que a refrigeração rápida do sêmen de 30 °C para 0 °C (WATSON, 2000) e até mesmo a redução de temperatura de 37 °C para 5 °C (LÓPEZ, 1999) induzem um estresse letal em algumas células, proporcional à taxa de refrigeração, intervalo de temperatura e ao limite de temperatura, conhecido como choque térmico, que causa rupturas na membrana plasmática com consequente perda de cátions e enzimas dos espermatozoides, diminuindo de forma irreversível sua motilidade e atividade metabólica (WHITE, 1993).

Apesar da diferença da motilidade espermática de tatus-peba ser significativa já na fase da refrigeração, o percentual de células móveis apresenta uma queda abrupta após a descongelação (6 %). Isso pode ser explicado devido ao fato de que os principais danos ocorrem durante a fase de congelamento-descongelamento, resultando em desestabilização e até mesmo a ruptura da membrana, perda de componentes intracelulares, tais como enzimas metabólicas e ATP, com a perda substancial de viabilidade (JANUSKASUSKAS et al., 1999; BAILEY et al., 2003). Entretanto, observou-se um percentual de espermatozoides com membrana plasmática intacta (12,3 %) superior aqueles que apresentavam alguma motilidade (6,1 %), indicando que a motilidade dos espermatozoides não reflete diretamente sobre a sua viabilidade, fato este considerado por SA-ARDRIT et al. (2006) que citam sobre a não

ocorrência de gestação em elefantas inseminadas artificialmente com amostras de sêmen descongelado, mesmo estas apresentando níveis aceitáveis de motilidade espermática.

Segundo PARKS et al. (1992), a membrana plasmática é o local primário de lesão aos espermatozoides criopreservados, entretanto, o aumento na concentração de proteínas no ejaculado pode aumentar a estabilidade da membrana espermática, reduzindo as chances de alterações induzidas pelo resfriamento (DeLEEuw et al., 1990). Quanto a isso, a adição da gema de ovo ao diluente pode ter promovido maior resistência à membrana plasmática de alguns espermatozoides de tatus-peba, durante a congelação-descongelação, devido ao incremento de proteínas de baixa densidade (LDL) ao sêmen, aumentando a resistência de algumas células espermáticas ao choque térmico, e melhorando a integridade da membrana plasmática (MOUSSA et al., 2002).

Por outro lado, apesar da maioria dos protocolos de criopreservação seminal em mamíferos considerarem o glicerol como um crioprotetor padrão (SILVA et al., 2003; WATSON, 2000), sabe-se que sua toxicidade promove mudanças osmóticas capazes de afetar a fluidez e as propriedades funcionais das membranas plasmáticas durante a criopreservação, em todas as suas fases (refrigeração, congelação, e descongelação) (BUHR et al., 1989; MAXWELL e JOHNSON, 1997; HAMMERSTEDT et al., 1990), podendo ser um dos motivos da elevada ocorrência de células inviáveis após a descongelação de espermatozoides de tatus-peba. No entanto, a criopreservação seminal em animais domésticos e silvestres, utilizando o glicerol em baixas concentrações (2,5 - 6 %), tem apresentado resultados bem sucedidos em diferentes espécies (SCHERZER et al., 2009; SILVA et al., 2003; SILVA et al., 2013), mas em tatus-peba ainda são necessários testes em busca da concentração adequada dessa substância, considerando que o tipo e a concentração ideal de crioprotetor para congelação de espermatozoides varia entre as espécies (HOLT, 2000).

Os fluoróforos utilizados para detectar os danos causados pela criopreservação sobre os espermatozoides de tatu-peba demonstraram um percentual de células com membrana plasmática viável maior (8,4 %) que o observado para motilidade, assim como verificado através da análise convencional, utilizando esfregaços corados com azul de bromofenol. Sabe-se que uma disfunção mitocondrial com consequente esgotamento na produção de ATP, pode ser mais um fator responsável pela diminuição da motilidade espermática geralmente observada depois a descongelação (MEDEIROS et al., 2002), ao mesmo tempo que após ruptura das membranas mitocondriais há relatos sobre a liberação de fatores pró-apoptóticos (RAVAGNAN et al., 2002) os quais podem passar para outros compartimentos espermáticos,

causando danos estruturais e funcionais irreparáveis a essas células (MARTIN et al., 2004). Segundo dados obtidos por fluorescência, é possível relacionar a presença de danos sobre a membrana plasmática com presença de mitocôndrias inativas, considerando a não existência de resposta positiva ao fluoróforo Mito Tracker red[®] para atividade mitocondrial em membranas lesionadas. Entretanto, foi observado em espermatozoides de tatu-peba uma proporção de células com membranas intactas mesmo com a ausência da atividade mitocondrial, podendo-se inferir sobre o efeito gradativo desses fatores pró-apoptóticos após a sua liberação.

As principais alterações morfológicas observadas no sêmen de tatu-peba são defeitos secundários (Tabela 4), e de um modo geral, suas proporções aumentam a partir da etapa de refrigeração, certamente devido ao choque térmico e ao estresse osmótico causados pelos procedimentos da criopreservação (SEAGER, 1986). Para evitar a formação de cristais de gelo, o glicerol promove a remoção da água intracelular, e, conseqüentemente, o encolhimento da célula, mais o influxo de íons. Durante a descongelação, como efeito inverso, ocorre o influxo de água, podendo ocasionar a ruptura da membrana (HOLT, 2000) semelhante ao que foi demonstrado neste estudo por imagem ultraestrutural (Figura 3 - A).

Formatos anormais da cabeça dos espermatozoides de tatus-peba também podem ser atribuídos ao processo de criopreservação devido aos danos nos componentes do citoesqueleto que estão alojados nos espaços estreitos entre o acrossomo e o núcleo, e entre o acrossomo e a membrana plasmática (EDDY e O'BRIEN, 1994). Segundo a revisão de WATSON (2000), existem alguns elementos do citoesqueleto espermático sensíveis a alterações de temperatura que podem ser despolimerizados. Ainda, observou-se que os danos acrossomais aumentaram significativamente na refrigeração e congelação (Tabela 4), contudo, notou-se elevados percentuais de espermatozoide com acrossomo intacto, semelhante ao que foi observado em sêmen canino (PEÑA et al., 1998). As lesões acrossomais de espermatozoides criopreservados verificadas neste experimento são caracterizadas, principalmente, pela capacitação precoce. A despolimerização da F-actina é uma das etapas necessárias para permitir a aproximação da membrana plasmática e da membrana acrossomal externa, promovendo a exocitose acrossomal e que, talvez, esta possa ser uma das explicações para a fusão desorganizada das membranas após o resfriamento e a criopreservação dos espermatozoides (WATSON, 2000). Danos desse tipo são provavelmente decorrentes da cristalização intracelular ocorrida durante o processo de criopreservação, que são claramente identificados por ultramicrografia, mas nem sempre visíveis com facilidade a partir das

observações por microscopia de luz. Esse fato pode justificar o baixo percentual de anormalidades acrossomais em amostras de sêmen descongelado de tatus-peba após análise clássica da morfologia espermática (Tabela 4).

Uma observação interessante, analisando as imagens por microscopia eletrônica de espermatozoides criopreservados de tatu-peba, foi a presença de danos à cromatina localizados adjacentes ao acrossoma, também descrito por JOHNSTON et al. (2012) em koalas. Sobre isso, esses autores esclarecem que danos à cromatina associados à crioinjúrias iniciam-se nas regiões periacrossomal e basal do espermatozoide e posteriormente se expandem para outras regiões do núcleo. Estudos apresentando danos ao DNA espermático, caracterizados por distribuição periférica discreta, foram associados à infertilidade em humanos (ZHANG et al., 2007).

Um outro evento associado à crioinjúria foi a presença de danos na bainha mitocondrial dos espermatozoides observados neste estudo. É conhecido que nas células espermáticas, as mitocôndrias produzem ATP na região da peça intermediária, proporcionando energia necessária para a manutenção dos processos de membranas celulares (SILVA e GADELLA, 2006) e motilidade (RAO et al., 1989). Alterações estruturais nessas organelas estão normalmente acompanhadas por desordens bioquímicas ou, ainda, perda de conteúdo vital (PESCH e BERGMANN, 2006), causando transtornos celulares pela liberação de fatores pró-apoptóticos (RAVAGNAN et al., 2002).

Em conclusão, este estudo é o primeiro relato de criopreservação em *Xenarthra*, e como tal, não atingiu a padronização da técnica de forma a proporcionar resultados satisfatórios. Porém, os resultados obtidos neste estudo, são consistentes para o aprimoramento do protocolo de criopreservação de sêmen de tatus-peba, que poderá ser possivelmente expansivo para outros tatus. A maioria das pesquisas sobre criopreservação de sêmen, testa sistematicamente a combinação de diferentes diluentes e concentrações de crioprotetores, para descobrir qual resultará em uma boa qualidade seminal pós descongelação (ABOAGLA e TERADA, 2004; SILVA et al., 2006;). Assim, após o aperfeiçoamento dessa técnica, como um passo audacioso, poderiam ser testados a interação oócito-espermatozoide para verificar o potencial de fertilidade *in vitro* de amostras seminais criopreservadas, e posteriormente testar os avanços por FIV ou ainda, através de IA (SCHMITT et al., 2001), concomitante aos avanços nos estudos com exemplares fêmeas desta espécie. Contudo, na ocorrência de restrições da capacidade fertilizante, os espermatozoides criopreservados de

tatu-peba ainda podem ser utilizados em técnicas mais sofisticadas, como a injeção intracitoplasmática (ICSI) (SUTTNER et al., 2000; CHOI et al., 2002).

A aplicação da técnica de criopreservação é particularmente crucial para a preservação do material genético de tatus, considerando que espécies como o tatu-bola (*Tolypeutes* sp.) e tatu canastra (*P.maximus*) estão listadas com risco ou vulnerabilidade à extinção (IUCN, 2013). Além disso, o estabelecimento da biotécnica de criopreservação em tatus-peba permite que o seu material seminal e de outras espécies semelhantes componham, no futuro, bancos de germoplasma para os xenartras, com intuito de promover a conservação genética desse grupo tão particular entre os mamíferos silvestres.

3.7 REFERÊNCIAS

ABOAGLA, E. M.; TERADA, T. Effects of the supplementation of trehalose extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat spermatozoa. **Theriogenology**, v. 62, p.809-818, 2004.

AMORIM, R.N.L.; EMERENCIANO, K.D.M.; SOUSA, P.C.; CASTELO,T.S.; LIMA,G.L.; SILVA, A.R.. Short-term preservation at 5°C of Armadillo's (*Euphractus sexcinctus*) semen. In: III INTERNATIONAL SYMPOSIUM ANIMAL BIOLOGY OF REPRODUCTION, ISABR, 2012, Campinas, SP. **Anais...**Campinas: ISABR, 2012. p. 971.

AMORIM, R.N.L.; SOUSA, P.C.; CASTELO, T.S.; SANTOS, E.A.A.; SILVA, A.R. Características do sêmen de tatus-peba (*Euphractus sexcinctus* Linnaeus, 1758) coletados por eletroejaculação utilizando diferentes protocolos anestésicos. In: XVII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFERSA, 2011, Mossoró, RN. **Anais...**Mossoró: UFERSA, 2011. p. 47.

BAILEY, J.L.; MORRIER, A.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in farm species: an update. **Can. J. Anim. Sci.**,v.83, p.393-401, 2003.

BUHR, M.M.; CANVIN, A.T.; BAILEY, J.L. Effects of semen preservation on boar spermatozoa head membranes. **Gamete. Res.**, v.23, p. 441–9, 1989.

CASTELO, T.S.; BEZERRA, F.S.B.; SOUZA, A.L.; MOREIRA, M.A.; PAULA, V.V.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. Influence of the thawing rate on the cryopreservation of semen from collared peccaries (*Tayassu tajacu*) using Tris-based extenders. **Theriogenology**, v.74, n.6, p.1060-5, 2010b.

CELEGHINI, E.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reprod. Domest. Anim.**, v.42, n.5, p.479-88, 2007.

CHOI, Y.H.; LOVE, C.C.; LOVE, L.B.; VARNER, D.D.; BRINSKO, S.; HINRICHS, K. Developmental in vitro-matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed spermatozoa. **Reproduction**, v. 123, p. 455-65, 2002

CRESPILHO, A.M.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; PAPA, F.O. Infertilidade associada a defeito microtubular dos espermatozoides de jumento (*Equus asinus*) avaliados por microscopia eletrônica de transmissão. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1507-1510, 2006.

DE LEEUW, F.E.; CHEN, H.C.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A.J. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. **Cryobiology**, v.27, p.171–183, 1990.

DOTT, H. M.; FOSTER, G. C. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential ‘live/dead’ stain. **J. Reprod. Fertil.**, v. 29, p. 443-445, 1972.

EDDY, E.M.; O'BRIEN, D.A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. **The fisiology of reproduction**. Cap. 2, p. 29-77, New York: Raven Press. 1994.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **J. Androl.**, v.11, p.73–88, 1990.

HEATH, E.; SCHAEFFER, N.; MERITT DA, J.R.; JEYENDRAN, R.S. Rouleaux formation by spermatozoa in the naked-tail armadillo, *Cabassous unicinctus*. **J. Reprod. Fertil.**, v.79, p.153-158, 1987.

HICKMAN JR, C.P.; ROBERTIS, L.S.; LARSON, A. **Princípios integrados de zoologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 846 p.

HOE, F.G.H.; SOUSA, F.F.; RINCA, L.; LOPES, M.D. Efeito do diluidor sobre a viabilidade das células espermáticas caninas, mantidas a 37°C. Ver. **Bras. Reprod. Anim.**, v. 25. p. 466-468. 2001.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 2-33, 2000.

IUCN. **Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN**, Versão Online. Disponível em: < <http://www.iucnredlist.org/search/details.php/8306/all>> Acesso: 5 jan. 2013.

JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; SÖDERQUIST, L.; HÅÅRD, M. G. M.; HÅÅRD, M. Ch.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden **Theriogenology**, v. 52, p. 641-658, 1999.

JOHNSTON, S.D.; SATAKE, N.; ZEE, Y.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; HOLT, W.V.; GOSÁLVEZ, J. Osmotic stress and cryoinjury of koala sperm: an integrative study of the plasma membrane, chromatin stability and mitochondrial function. **Reproduction**, v. 143, n.6, p.787-97, 2012.

LÓPEZ, A.; SÖDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm viability in ram semen diluted and stored in three different extenders. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 40, p. 1-9, 1999.

MARTIN, G.; SABIDO O.; DURAND, P.; LEVY, R. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. **Biol. Reprod.**, v.71, p.28–37, 2004.

MAXWELL, W.M.; JOHNSON, L.A. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling or cryopreservation. **Mol. Reprod. Dev.**, v.46, p.408–18, 1997.

MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, p. 327-344, 2002.

MENDONÇA, M.A.C. **Análise descritiva do perfil espermático do tamanduá-bandeira (*Mirmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758) de cativeiro**. 2010. 81f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2010.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.57, p.1695-1706, 2002.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38,p.209–22, 1992.

PERES, M. A.; BENETTI, E.J.; MILAZZOTTO, M.P.; VISINTIN, J.A.; MIGLINO, M.A.; ASSUMPÇÃO, M.E. Collection and evaluation of semen from the three-toed sloth (*Bradypus tridactylus*). **Tissue Cell**, v. 40, p. 325–331, 2008.

PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. **Micron**, v. 37, p. 597-612, 2006.

PUKAZHENTHI. B.; COMIZZOLI, P.; TRAVIS, A.J.; WILDT, D.E. Applications of emerging technologies to the study and conservation of threatened and endangered species. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.18, p.77–90, 2006.

PURDY, P.H.; THARP, N.; STEWART, T.; SPILLER, S.F.; BLACKBURN, H.D. Implications of the pH and temperature of diluted, cooled boar semen on fresh and frozen-thawed sperm motility characteristics. **Theriogenology**, v.74, n.7, p.1304-10, 2010

RAO, M. V. Histophysiological changes of sex organs in methylmercury intoxicated mice. RAVAGNAN, L.; ROUMIER, T.; KROEMER, G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. **J. Cell. Physiol.**, v.192, p.131–137, 2002.

SA-ARDRIT, M.; SAIKHUN, J.; THONGTIP, N.; DAMYANG, M.; MAHASAWANGKUL, S.; ANGKAWANISH, T.; JANSITTIWATE, S.; FAISAIKARM, T.; KITTIYANANT, Y.; PAVASUTHIPAISIT, K.; PINYOPUMMIN, A. Ultrastructural alterations of frozen-thawed Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa. **Int. J. Androl.**, v.29, p.346–352, 2006.

SANTOS, E.A.A.; SOUSA, P.C.; DIAS, C.E.V.; CASTELO, T.S.; PEIXOTO, G.C.X.; LIMA, G.L.; RICARTE, A.R.F.; SIMÃO, B.R.; FREITAS, C.I.A.; SILVA, A.R. Assessment of sperm survival and functional membrane integrity of the six-banded armadillo (*Euphractus sexcinctus*). **Theriogenology**, v.76, n.4, p.623-9, 2011.

SCHERZER, J.; FAYRER-HOSKEN, R.A.; ACEVES, M.; HURLEY, D.J.; RAY, L.E.; JONE, L.; HEUSNER, G.L. Freezing equine semen: the effect of combinations of semen extenders and glycerol on post-thaw motility. **Aust. Vet. J.**; v.87, p.275–9, 2009.

SCHMITT, D.L.; HILDEBRANT, T.B.; HERMES, R.; GORITZ, F. Assisted reproductive technology in elephants. In: **Proceedings of the 1st International Symposium Assisted Reproductive Technology of Conservation Genetics Management in Wildlife**, 2001, pp. 15–17. Omaha's Henry Doorly Zoo, Omaha, NE.

SEAGER, S.W.J. **Artificial insemination in dogs**. In: BURKE, T.J. Small animal reproduction and infertility: a clinical approach to diagnosis and treatment. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 207-217, 1986.

SERAFIM, M.K.B.; LIRA, R.A.; COSTA, L.L.M.; GADELHA, I.C.N.; FREITAS, C.I.A.; SILVA, A.R. Description of semen characteristics from six-banded armadillos (*Euphractus sexcinctus*) collected by electroejaculation. **Anim. Reprod. Sci.**, v.118, p. 362–5, 2010.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M.; CHIRINÉA, V.H.; SOUZA, F.F. Prognostic value of canine frozen-thawed semen parameters on in vitro sperm-oocyte interactions. **Theriogenology**, v.66, p.456-462, 2006.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. **Theriogenology**, v.59, p.821–9, 2003.

SILVA, A.R.; FONTENELE-NETO, J.D.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M.; CHIRINÉA, V.H.; LOPES, M.D. Description of ultrastructural damages in frozen-thawed canine spermatozoa. **Ci. Anim. Brasi.**, v. 10, n. 2, p. 595-601, 2009.

SILVA, M.A.; PEIXOTO, G.C.; CASTELO, T.S.; LIMA, G.L.; SILVA, A.M.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasiprocta aguti*) using powdered coconut water (ACP-109c) and Tris extenders. **Theriogenology**, v.76, n.6, p.1084-9, 2011.

SILVA, M.A.; PEIXOTO, G.C.X.; LIMA, G.L.; BEZERRA, J.A.B.; CAMPOS, L.B.; PAIVA, A. L.C.; PAULA, V.V.; SILVA, A.R. Cryopreservation of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) semen using a powdered coconut water (ACP-116c) based extender plus various concentrations of egg yolk and glycerol. **Theriogenology**, v.78, n.3, p.605-11, 2012.

SILVA, P.F.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v.15, p.65, n.5, p.958-78, 2006.

SILVA, M.A.; PEIXOTO, G.C.; CASTELO, T.S.; LIMA, G.L.; SILVA, A.M.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. Cryopreservation of collared peccary (*Pecari tajacu*) semen using different freezing curves, straw sizes, and thawing rates. **Cryobiology**, v.67, n.1, p.50-5, 2013.

STOOPS, M.A.; ATKINSON, M.W.; BLUMER, E.S.; CAMPBELL, M.K.; ROTH, T.L. Semen cryopreservation in the indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*). **Theriogenology**, v.73, p. 1104-1115, 2010.

SUTTNER, R.; ZAKHARTCHENKO, V.; STOJKOVIC, P.; MÜLLER, S.; ALBERIO, R.; MEDJUGORAC, I.; BREM, G.; WOLF, E.; STOJKOVIC, M. Intracytoplasmic sperm injection in bovine: effects of oocyte activation, sperm pretreatment and injection technique. **Theriogenology**, v.1, n.54(6), p.935-48, 2000.

THONGTIP, N., YINDEE, M., DAMYANG, M., SUTHUMMAPINUNTA, P., MAHASAWANGKUL, S., ANGKAWANISH, T. The Optimum Temperature and Extenders for Preservation of Asian Elephant Semen Collected by Manual Collection. **Proceeding...** The 40th Kasetsart University Animal Conference, Bangkok, Thailand, 2002. pp. 305–311.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Ani. Repro. Sci.**, v.61-61, p.481–92, 2000.

WHITE, I. G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 5, p. 639-658, 1993.

ZHANG X, SAN GABRIEL M, LIBMAN J, PHILLIPS S, COURCHESNE A & ZINI A. Localization of single-stranded DNA in human sperm nuclei. **Fertil. Steril.**, v.88, p.1334–1338, 2007.

4. CONSIDERAÇÕES E PERSPECTIVAS

Estudos realizados nos últimos anos resultaram no desenvolvimento de protocolos voltados para a criopreservação de gametas em uma grande variedade de espécies animais, e em muitos casos, como nos indivíduos domésticos, essa biotécnica avançou, sendo utilizada em larga escala. No que se refere às espécies silvestres, a criopreservação ainda está em processo de expansão, e, mais especificamente, nos xenartras, os estudos ainda são iniciais.

Quando submetido à criopreservação, o material seminal responde variavelmente de acordo com a espécie, impossibilitando a generalização e o desenvolvimento de um protocolo universal. As pesquisas na área de criobiologia vem sendo conduzidas com o objetivo de melhorar os conhecimentos dos mecanismos biológicos que controlam a tolerância das células espermáticas à congelação. Assim, o aprofundamento no conhecimento da fisiologia reprodutiva das espécies silvestres têm sido usado para melhor investigar os mecanismos e as causas de injúria induzidos pela criopreservação, resultando em numerosas descobertas para aprimorar as técnicas de criopreservação e para superar as dificuldades associadas à aplicação em espécies pouco exploradas, como é o caso do tatu-peba.

O presente estudo possibilitou a obtenção de informações úteis para o aperfeiçoamento dos protocolos de congelação nesta espécie, identificando pontos críticos do processamento que interferem na sobrevivência e sensibilidade dos espermatozoides às condições de armazenamento em baixíssimas temperaturas. Contudo, testes básicos como aqueles aplicados para liquefação do plasma seminal, bem como a análise de diferentes concentrações de crioprotetores adicionados ao diluente, devem ser utilizados em tatus-peba, a fim de indicar meios seminais adequados à criopreservação, e que podem ter sua eficiência comprovada após testes de fertilização espermática através de IA, interação espermatozoide-oócito, ou FIV. Do ponto de vista prático, os protocolos de criopreservação em tatus-peba precisam ser definidos para a aplicação desta técnica, por ser particularmente crucial para a preservação do material genético desta espécie, considerando a sua aplicabilidade extensiva à outras espécies do mesmo grupo que se encontram listadas em perigo ou vulnerabilidade à extinção. Além disso, o estabelecimento da biotécnica de criopreservação em tatus-peba permite que o seu material seminal e de outras espécies semelhantes componham, no futuro, bancos de germoplasma para os xenartras, com intuito de promover a conservação genética desse grupo tão particular entre os mamíferos silvestres.

ANEXOS

ANEXO 1 – CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO “EFEITOS DA CENTRIFUGAÇÃO E DA DILUIÇÃO SOBRE A TERMORRESISTÊNCIA E A VIABILIDADE DO SÊMEN DE TATUS-PEBA (*Euphractus sexcinctus*)” À REVISTA CIÊNCIA RURAL.

30-Jul-2013

Dear Mrs. Sousa:

A manuscript titled Efeitos da centrifugação e da diluição sobre a termorresistência e a viabilidade do sêmen de tatus-peba (*Euphractus sexcinctus*) (CR-2013-1015) has been submitted by Mrs. Patrícia Sousa to the Ciência Rural.

You are listed as a co-author for this manuscript. The online peer-review system, ScholarOne Manuscripts, automatically creates a user account for you. Your USER ID and PASSWORD for your account is as follows:

Site URL: <http://mc04.manuscriptcentral.com/cr-scielo>

USER ID: pattbio13@hotmail.com

PASSWORD: For security reasons your password is not contained in this email. To set your password click the link below.

http://mc04.manuscriptcentral.com/cr-scielo?URL_MASK=cGtCDX6MNrtSwmbt37n2

You can use the above USER ID and PASSWORD (once set) to log in to the site and check the status of papers you have authored/co-authored. Please log in to <http://mc04.manuscriptcentral.com/cr-scielo> to update your account information via the edit account tab at the top right.

Thank you for your participation.

Sincerely,

Ciência Rural Editorial Office

ANEXO 2 – DILUIÇÕES E PREPARO DAS SONDAS FLUORESCENTES

Iodeto de Propídio (Sigma-Aldrich, 25mg)

Solução de estoque: 25 mg de PI + 1mL de DMSO (25mg/mL)

Obs: Armazenar em freezer, no escuro.

Solução de trabalho (2 mg/mL):

80µL da solução estoque de PI (25mg/mL) + 920 µL de DPBS

CMXRos (Mito Tracker Red®) (Molecular Probes, M7512 – 20 x 50µg)

Solução de estoque: 500 µM ou 50 µg Mito Tracker Red® em 94µL DMSO

Obs: Armazenar em freezer, no escuro.

Solução de trabalho: 0,1 µL da solução de estoque em 1mL Tris

Hoechst 33342 (Molecular Probes, H-1399 – 25mg)

Solução de estoque: 25mg H342 + 1mL de DMSO

Obs: aliquotar em 10 µL e armazenar em -20°C, no escuro

Solução de trabalho: 1,6 µL da solução de estoque + 998,4 µL de DPBS