

## *Tris-plasma, tris-mel e epididimossomas para o congelamento seminal: indicação para uma perspectiva futura*

A utilização de diluentes que garantam a proteção da célula espermática é de suma importância não apenas de forma a garantir melhor qualidade no descongelamento e uma manutenção da capacidade de fertilização, mas principalmente visando uma linhagem capacitada e saudável. Nesse contexto, estudos baseados na utilização de melhores substâncias para o manejo e preservação das células são conduzidos todos os anos, em diversas espécies. Nesta revisão, apresentamos algumas deliberações e estudos relacionados à dois diluentes e um aditivo com baixa utilização, mas com resultados encorajadores. Epididimossomas são vesículas extracelulares secretadas no epidídimo, sendo responsáveis pelo processo de maturação do espermatozoide, eliminação de espermatozoides defeituosos e proteção do estresse oxidativo, entre outros. Tanto o TEYP quanto o TRIS-mel demonstraram proteger os espermatozoides dos danos causados pelo frio, especialmente no DNA, frequentemente demonstrando resultados superiores aos de substâncias mais conhecidas e extensivamente utilizadas, parecendo haver indicação da possibilidade de utilização com sucesso de um diluente misto, com as duas substâncias. Espera-se que ao final desta contenda, estimular colegas a trabalharem com estas substâncias pouco ortodoxas, mas com resultados promissores.

**Palavras-chave:** Epididimossomas; Criopreservação Espermática; Crioprotetores; Tris-Mel; Tris-Plasma-de-Gema.

## *Tris-plasma, tris-mel and epididymosomes for seminal freezing: indication for a future perspective*

The use of extenders that guarantee the protection of the sperm cell is of great importance, not only to guarantee a better quality in the thawing and maintenance of the fertilization capacity, but mainly aiming at a capable and healthy lineage. In this context, studies based on the use of better substances for the management and preservation of cells are conducted every year, in different species. In this review, we present some deliberations and studies related to two diluents and an additive, still used timidly, but with encouraging results. Both TEYP and TRIS-honey have been shown to protect spermatozoa from damage caused by the cold, especially in DNA, often demonstrating results superior to those of more known and extensively used substances, and there seems to be an indication of the possibility of successfully using a mixed diluent, with the two substances. Epididymosomes are extracellular vesicles secreted in the epididymis, being responsible for the process of sperm maturation, elimination of defective sperm and protection from oxidative stress, among others. It is hoped that at the end of this dispute, colleagues will be encouraged to work with these unorthodox substances, but with encouraging results.


**Keywords:** Epididymosomes; Sperm Cryopreservation; Cryoprotectants; Tris-Honey; Tris-Egg-Yolk-Plasma.


Topic: **Fisiologia**

Received: **10/11/2023**


Approved: **11/12/2023**


Reviewed anonymously in the process of blind peer.

**Fernanda Rodrigues Mendonça**   
Universidade Federal de Pelotas, Brasil  
<http://lattes.cnpq.br/7538503892376309>  
<https://orcid.org/0000-0002-6395-4448>  
[nandarm.vet@gmail.com](mailto:nandarm.vet@gmail.com)

**Antônio Sérgio Varela Júnior**   
Universidade Federal do Rio Grande, Brasil  
<http://lattes.cnpq.br/8041711996066835>  
<https://orcid.org/0000-0003-4901-5118>  
[varelajras@gmail.com](mailto:varelajras@gmail.com)

**Izani Bonel Acosta**  
Universidade Federal de Pelotas, Brasil  
<http://lattes.cnpq.br/3802256283765513>  
[izanibonel@hotmail.com](mailto:izanibonel@hotmail.com)

**Inaraã Dias da Luz**   
Universidade Federal de Pelotas, Brasil  
<http://lattes.cnpq.br/3134508687951044>  
<https://orcid.org/0000-0001-7880-7208>  
[inadiasmedvet@gmail.com](mailto:inadiasmedvet@gmail.com)

**Carine Dahl Corcini**   
Universidade Federal de Pelotas, Brasil  
<http://lattes.cnpq.br/7340307576119827>  
<https://orcid.org/0000-0001-5683-7801>  
[corcinicd@gmail.com](mailto:corcinicd@gmail.com)



DOI: 10.6008/CBPC2236-9600.2024.001.0002

### Referencing this:

MENDONÇA, F. R.; VARELA JÚNIOR, A. S.; ACOSTA, I. B.; LUZ, I. D.; CORCINI, C. D.. Tris-plasma, tris-mel e epididimossomas para o congelamento seminal: indicação para uma perspectiva futura. **Scire Salutis**, v.14, n.1, p.13-23, 2024. DOI:  
<http://doi.org/10.6008/CBPC2236-9600.2024.001.0002>

## INTRODUÇÃO

Apesar de amplamente utilizados, os processos de resfriamento e congelamento são extremamente estressantes para a célula. Podemos citar como alguns dos estressores enfrentados nesses processos: a formação de cristais de gelo intracelulares, além de variação brusca na osmolaridade e no pH. São processos que contribuem para um maior dano à membrana celular, aumento dos níveis de espécies reativas em oxigênio (ROS) intracelulares e menor integridade do DNA (NANGIA *et al.*, 2013; HEZAVEHEI *et al.*, 2018; VALIPOUR *et al.*, 2021). Esses danos estruturais tendem a diminuir a viabilidade espermática, assim como sua capacidade de fertilização, havendo comumente alterações epigenéticas provocadas tanto pelos agentes quanto pelas técnicas utilizadas (URREGO *et al.*, 2014). Essas alterações podem ser parcialmente contornadas através da utilização de epididimossomas, que possuem mRNA e outras proteínas em seu interior, possuindo a capacidade de alterar a epigenética da população (PAUL *et al.*, 2021).

O ambiente circundante da célula criopreservada deve fornecer condições necessárias para que o espermatozoide suporte a variação de temperatura e minimize as alterações físicas sofridas. Os componentes do diluente ainda podem induzir modificações na organização lateral de lipídios e proteínas que resultarão em desestabilização da membrana (PINI *et al.*, 2018). De forma geral, os meios de criopreservação de sêmen são compostos por tampão (TRIS), crioprotetor não permeável (gema de ovo), crioprotetor permeável (glicerol), fonte de energia e aditivos (antibióticos, antioxidantes, epididimossomas e outros). Estes agentes buscarão minimizar os efeitos deletérios da variação da temperatura sobre a célula (ABDELHAFEZ *et al.*, 2009).

Nesse artigo, faremos uma revisão sobre dois diluidores e um aditivo para proteção da célula espermática no manejo laboratorial, que apesar de não serem amplamente utilizados na rotina, possuem grande capacidade de serem aliados no combate ao estresse térmico, garantindo um melhor desempenho do que diluentes comumente utilizados no momento, ao tentarem corrigir os pontos críticos identificados no processamento de amostras seminais que ainda persistem, apesar dos avanços nas técnicas de manejo e preservação seminal.

O tema se justifica na busca recorrente de melhores técnicas de manejo e de componentes mais adequados para a preservação seminal. A necessidade da utilização destas tecnologias vem aumentando não apenas em um contexto animal ou científico, mas também para reprodução humana e manutenção da variabilidade genética do planeta. Nessa conjuntura, estudos pautados na utilização de melhores substâncias para manuseio e conservação de células são de extrema importância, não apenas para os profissionais envolvidos, mas também para a sociedade.

Com esse intuito, a pesquisa foi realizada de forma a contornar estes contratempos, mesmo que através de substâncias menos ortodoxas, como as expostas aqui. Espera-se que ao final desta arguição, um maior número de profissionais se sinta intrigados por elas e decidam às incorporar à rotina. A pesquisa teve sua coleta de dados respaldada em artigos científicos pesquisados nas plataformas digitais: *PubMed*, *Google Scholar*, *Research Gate* e Banco de Teses e Dissertações da CAPES (BTD).

## REVISÃO TEÓRICA

### A Problemática da Criopreservação

Quando expostos à desafios, - como por exemplo a variação brusca de osmolaridade e pH, aumento de viscosidade, separação do fluido seminal e formação de cristais de gelo intracelulares, as células espermáticas podem ter as membranas plasmáticas desestabilizadas, acrossoma lesado, diminuição da integridade do DNA e aumento dos níveis de ROS (VALIPOUR *et al.*, 2021).

Espermatozoides com DNA danificado são capazes de fertilizar oócitos, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (CEREZALES *et al.*, 2010), uma vez que o oócito possui enorme capacidade de reparo do DNA, contudo se o dano ao DNA excede essa capacidade de restauração, erros de leitura poderão ocorrer durante a replicação (MENEZO *et al.*, 2010; VALCARCE *et al.*, 2013). São conhecidos e relatados diversos casos que comprovam que o dano ao DNA espermático causará os mais diversos obstáculos à formação do indivíduo, seja na nidação, desenvolvimento embrionário ou exacerbamento de doenças perinatais e do amadurecimento. Estes eventos já foram descritos em diversas espécies e seus efeitos deletérios à prole já foram confirmados. Em peixes, por exemplo, gerou uma progênie com eclosão tardia e com taxa de crescimento reduzida (NUSBAUMER *et al.*, 2019).

Camundongas da progênie fruto de inseminação artificial com sêmen congelado tiveram aumento na ansiedade, déficit na memória espacial de curto prazo e hipolocomoção. Também houve um aumento significativo na mortalidade nos primeiros cinco meses de vida dos animais dos grupos teste, assim como exacerbamento nas patologias apresentadas após análise anatomopatológica dos animais idosos (GONZALES *et al.*, 2008).

Crianças fruto de material congelado e nascidas sem problemas perinatais tiveram neurodesenvolvimento normal, porém não tão elevado quanto as que foram fruto de concepção natural, sendo mais significativa a diferença nas áreas de locomoção e linguagem. Ou seja, existem estudos relatando que a criopreservação de células reprodutivas está associada a padrões de neurodesenvolvimento menores que a média (NEVES, 2016). Alguns dos outros eventos negativos relatados em progênie proveniente de material congelado incluem: apoptose após as primeiras clivagens (FATEHI *et al.*, 2006), diminuição na implementação do embrião, aborto e doenças neonatais (ZINI *et al.*, 2008; AITKEN *et al.*, 2009), taxas de transcrição alteradas para genes envolvidos no crescimento e diferenciação celular (CEREZALES *et al.*, 2010).

Estes fenômenos não dependem apenas da curva de resfriamento ou da exposição ao fluido seminal, mas também da concentração dos crioprotetores, por isso é necessário cautela ao se adaptar diluentes. Se osmolaridade for muito elevada, por exemplo, a maior parte da água fluirá para fora e os solutos intracelulares serão concentrados, ou seja, as células irão experimentar encolhimento de organelas e membranas. O estresse hipertônico resultante pode alterar o equilíbrio eletrolítico e levar os espermatozoides a incharem além de seu volume normal, sofrendo lise no descongelamento e indução de uma fusão irreversível da membrana (GAO *et al.*, 2000).

## Como Diminuir o Dano ao Espermatozoide?

Conforme discutido anteriormente, a criopreservação é um processo estressante para a célula e pode desencadear diversos efeitos deletérios. Para melhor compreendermos como protegê-las, primeiro precisamos assimilar que espermatozoides são células pequenas, porém com grande superfície, o que os torna menos criotolerantes e mais propensos à crioinjúria (MORRIS *et al.*, 2012). Em seguida, deduz-se que o fator chave para manutenção da integridade funcional do espermatozoide criopreservado está no ambiente que o circunda. Este diluente deve fornecer as condições adequadas de osmolaridade, pH, energia e viscosidade de forma a possibilitar que o esperma suporte a diminuição da temperatura e minimize os danos estruturais sofridos (PINI *et al.*, 2018).

O efeito protetor destas substâncias possui diversos mecanismos, que servem para classificá-las. Podem agir diminuindo o ponto de congelamento intracelular, penetrar a célula e interagir com componentes citoplasmáticos, assim como formar uma camada protetora ao redor dos espermatozoides. São normalmente divididos em permeáveis e não permeáveis (Di Santo *et al.*, 2012) e suas características serão expostas a seguir.

Crioprotetores não permeáveis, como o leite, a gema de ovo, o mel e a albumina são compostos de maior peso molecular, o que os impossibilita de atravessar a bicamada fosfolipídica, portanto agem ao aumentar a viscosidade e prevenir a formação de cristais de gelo, além de estabilizar proteínas e membranas (SANTO *et al.*, 2012). Outras substâncias, como a LDL ou a lecitina de soja, possuem a capacidade de substituir fosfolípidios perdidos ou danificados da membrana e combater diretamente a ROS (QUINN *et al.*, 1980; SHAHVERDI *et al.*, 2015). Quando utilizados em conjunto com crioprotetores intracelulares (ou permeáveis) aumentam a eficácia dos mesmos, porém não são capazes de proteger as células quando usados sozinhos (BENSON *et al.*, 2012).

Crioprotetores permeáveis passam pela membrana celular e substituem a água intracelular. Podemos citar como exemplos o glicerol, o dimetil sulfóxido (DMSO) e etilenoglicol (SANTO *et al.*, 2012). Estes agentes se inserem na bicamada lipídica, alterando suas propriedades e taxas de difusão, além de alterar a viscosidade do citoplasma (HOLT, 2000).

A adição de antioxidantes ao diluente também é benéfica, uma vez que diminuem a geração de ROS e previnem o dano que estas causariam à membrana celular, melhorando a qualidade seminal no descongelamento. Estes podem ser separados em enzimáticos e não enzimáticos. Como enzimáticos podemos citar a catalase e a glutathione peroxidase. Exemplos de antioxidantes não enzimáticos incluem as vitaminas C e E, glutathione, selênio e zinco (ZHANG *et al.*, 2012).

## Tris Plasma de Gema de Ovo (TEYP)

O diluente TEY é extensivamente utilizado na prática de laboratórios de andrologia, obtendo resultados aceitáveis em diversas espécies (BERGERON *et al.*, 2006). A gema de ovo é rica em lipídios, tanto de alta quanto baixa densidade, ajudando na proteção contra a formação de cristais de gelo intracelulares

(SILVA *et al.*, 2005). É constituída majoritariamente de duas frações: plasma e grânulos. Os grânulos são formados predominantemente por lipoproteínas de alta densidade (HDL), que dificultam a leitura de campos de análise, reprimem a respiração celular e aumentam a dificuldade de locomoção dos espermatozoides, ou seja, diminuem a qualidade de fertilização da amostra (CORCINI *et al.*, 2015); também aumentam a viscosidade do diluente e causam um declínio geral na qualidade seminal, com um aumento considerável de atividade da acrosina, ao causar um efluxo de colesterol na membrana plasmática e alterar a fluidez da mesma (CHELUCCI *et al.*, 2015).

Já a porção do plasma é constituída principalmente de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que é responsável pelas propriedades crioprotetoras da gema (BERGERON *et al.*, 2006; ANTON, 2013). O LDL se incorpora à membrana plasmática do espermatozoide e substitui os fosfolipídios perdidos ou danificados durante o estresse térmico (QUINN *et al.*, 1980), além de formar um complexo entre essas e as proteínas do plasma seminal, evitando o efluxo de fosfolipídios e colesterol da membrana espermática criando uma barreira protetora contra o estresse pelo frio (BERGERON *et al.*, 2006).

O TEYP é obtido ao se ultracentrifugar TEY, de forma a precipitar as moléculas de maior peso – dentre elas, o HDL (SHAH *et al.*, 2016). Este diluente já foi utilizado com sucesso na criopreservação de espermatozoides de cães (SOMI *et al.*, 2021), búfalos (SHAH *et al.*, 2017) e galos (PANAHI *et al.*, 2017), dentre outros (tabela 1). Ou seja, o TEYP é uma alternativa viável e com resultados superiores ao TEY nas espécies testadas até agora.

**Tabela 1:** Estudos selecionados, nos últimos oito anos, da utilização do TEYP como crioprotetor extracelular.

Autor	Ano	Diluente	Aditivo	Espécie	Resultado
Shah <i>et al.</i>	2016	TEYP ácido cítrico	----	Búfalo	A concentração de 20% de TEYP melhorou o desempenho pós descongelamento e a capacidade de fertilização <i>in vitro</i> .
Perumalet <i>al.</i>	2016	TEYP	Penicilina e estreptomicina	Touro	TEYP 8% obtiveram melhor desempenho quando comparada à TEY 8% e 10%, assim como TEYP 10%.
Panahiet <i>al.</i>	2017	TEYP	Leite desnatado de camelo	Galo	A concentração de 20% de TEYP, apresentou resultados superiores.
Mehdipouret <i>al.</i>	2018	TEYP	Lecitina de soja	Galo	A concentração de 20% de TEYP suplementado com 1% de lecitina melhorou a fertilidade e taxa de eclodibilidade.
Belalaet <i>al.</i>	2018	TEYP	Estreptomicina e enrofloxacin	Cão	A concentração de 40% de TEYP foi efetiva na proteção no congelamento.
Mortazaviet <i>al.</i>	2020	TEYP	DMSO + Ácido oleico	Carneiro	O grupo TEYP 28% apresentaram resultados superiores aos demais grupos.
Singh <i>et al.</i>	2020	TEYP	----	Carneiro	TEYP 15% se mostraram superior à todas as outras concentrações de TEY e TEYP.
Somiet <i>al.</i>	2021	TEYP	Equex	Cão	20% TEYP teve um desempenho inferior ao 20% TEY.

### Tris-Mel

O mel é uma substância produzida por insetos da família *apidae*. É doce e viscosa, tendo sido amplamente utilizada não apenas como alimento, mas também como medicamento (BAMBANG *et al.*, 2019). Tem sido estudada com diferentes finalidades dentro do manejo seminal, tais como antioxidante, fonte de energia, antimicrobiano e agente crioprotetor extracelular (BANDAY *et al.*, 2017; NASREEN *et al.*, 2019).

Já foram identificados até o momento em torno de 600 compostos voláteis em méis. Possuem compostos cíclicos, como benzeno e seus derivados, álcoois, furano, norisoprenóides, aldeídos, ésteres de ácido, pirano, terpeno e seus derivados, assim como enxofre, cetonas e hidrocarbonetos. Trinta e um minerais diferentes também foram encontrados em amostras, incluindo fósforo, sódio, cálcio, enxofre,

magnésio e cloro. Dentre os ácidos orgânicos que podem ser encontrados, podemos citar o ácido glucônico. Além disso, o mel contém vestígios de vitaminas do complexo B, bem como ácido ascórbico. Uma variedade de enzimas também está presente, como oxidase, amilase, catalase e outras (CHEEPA *et al.*, 2022).

O mel possui d-glicose e d-frutose como fontes de energia (NAYIK *et al.*, 2015), e sua atividade antimicrobiana é fornecida devido à alta concentração de açúcares (ZOHEIR *et al.*, 2015), geração de peróxido de hidrogênio (AURONGZEB *et al.*, 2011) e à presença de defensina-1 de abelha e metilglioxal (KWAKMAN *et al.*, 2012; MOLAN *et al.*, 2019), ou seja, o mel pode substituir o uso de açúcares e antibióticos no diluidor.

Além disso, quando utilizados como crioprotetores extracelulares, possuem baixa toxicidade (HERRICK *et al.*, 2016) e diversos mecanismos nos quais agem para proteger a célula (LIANG *et al.*, 2017), como aumento da pressão osmótica e desidratação celular (MUKAIDA *et al.*, 2012), promoção de reidratação segura (HAN *et al.*, 2009) e redução da formação de cristais de gelo intracelulares, ao atuar diretamente na termodinâmica do processo (ELLIOTT *et al.*, 2017).

Apesar dos dados limitados quanto à sua utilização como crioprotetor extracelular, ainda possui resultados encorajadores. O mel já foi utilizado com sucesso no congelamento de espermatozoides de cabras (MAIDIN *et al.*, 2018) e garanhões árabes (EL-SHESHTAWY *et al.* 2016), entre outros. Mais trabalhos podem ser encontrados na tabela 2, abaixo.

**Tabela 2:** Estudos selecionados, nos últimos oito anos, da utilização do mel na criopreservação e resfriamento seminal.

Autor	Ano	Diluyente	Aditivo	Espécie	Resultado
El-Sheshtawyet <i>al.</i>	2016	INRA-82 modificado	Mel	Cavalo	O mel na concentração de 3% se mostrou mais eficiente do que os outros grupos.
Al-Saadi	2016	Ferti-Pro	Mel	Humano	A suplementação de 10% de mel ao crioprotetor forneceu melhor proteção à morfologia e ao DNA.
Banday <i>et al.</i>	2017	TEY	Mel	Carneiro	O mel funcionou bem como fonte de energia e pode cuidar de cargas microbianas mais leves.
Abinawanto <i>et al.</i>	2017	Mel	----	Peixes Gourami	A combinação de mel e DMSO se mostrou uma alternativa viável.
Kandiel <i>et al.</i>	2017	Leite	Mel	Búfalo	A incorporação de mel ao leite protegeu a célula espermática de maneira efetiva, além de ter melhorado a capacidade de fertilização <i>in vitro</i> .
Maidin <i>et al.</i>	2018	Mel	Nigella sativa	Bode	A combinação de mel e Nigella sativa se mostrou favorável na manutenção de espermatozoides congelados.
Sarmadi <i>et al.</i>	2019	HEPES-SFB	Mel	Ratos	O mel substituiu com êxito a sacarose em soluções de vitrificação de embriões.
Nasreen <i>et al.</i>	2019	TEY	Mel	Búfalo	O mel de Z. jujuba a 0,2% serve como alternativa ao antibiótico.
Abinawanto <i>et al.</i>	2019	Ringer	Mel e metanol	Botia-palhaço	A concentração de 0,1% de mel se mostrou superior às de controle.
Chung <i>et al.</i>	2019	Bioxcell	Mel	Touro	A concentração de 1% de mel adicionada ao diluyente Bioxcell preservou a qualidade seminal pós-descongelamento.
Castro <i>et al.</i>	2020	Mulberry III®	Mel	Javali	O mel se demonstrou efetivo na proteção da célula espermática.
Güngör <i>et al.</i>	2021	TEY	Mel	Cervo	A concentração de 1% de mel se mostrou eficiente na proteção dos parâmetros espermáticos do sêmen no congelamento.
Lan <i>et al.</i>	2021	BTS	Mel	Javali	As concentrações de 0,5% e 0,6% de mel adicionado ao diluidor exerce funções antimicrobiana e antioxidantes.
El-Nady <i>et al.</i>	2022	TEY	Mel	Dromedário	A adição de 2,5% de mel ao diluyente aumentou significativamente parâmetros espermáticos.

Existem estudos em que o mel possui baixo desempenho quando comparado aos demais grupos (YIMER *et al.*, 2015; MUCHLISIN *et al.*, 2015; CHUNG *et al.*, 2019; ABINAWANTO *et al.*, 2019; EL-NADY *et al.*, 2022), porém, é possível inferir que nestes são utilizadas concentrações elevadas. Isso se justifica uma vez que o mel é uma substância viscosa que em quantidades elevadas podem produzir efeito deletério sobre o

espermatozoide. Os graus de viscosidade suportados pelas células são espécie-específicos, o que demonstra a importância da testagem de diversas concentrações do diluente testado para constatação das concentrações tóxicas e benéficas. Em outras palavras, a utilização do mel na diluente seminal melhora a viabilidade e funcionabilidade das células reprodutivas animais, desde que sejam tomados cuidados relativos ao aumento de viscosidade e a concentração da substância que a célula espermática da espécie suporta sem toxicidade.

## Epididimossomas

Durante o processo de maturação espermática, a membrana espermática passa por uma remodelação constante através da exposição destas células a vesículas extracelulares secretadas por células epiteliais do epidídimo (GERVASI *et al.*, 2017). Estas vesículas, chamadas de epididimossomas, revelaram presença de metabólitos, mRNAs não codificantes, proteínas e fosfolipídios no seu interior (PAUL *et al.*, 2021). Os epididimossomas possuem diâmetros diversificados e sua composição varia tanto entre espécies quanto em regiões do epidídimo. Essas substâncias irão controlar a motilidade dos espermatozoides, proteger contra estresse oxidativo, eliminar espermatozoides defeituosos e induzir a capacidade de interação com a zona pelúcida (HASSAN *et al.*, 2021).

**Tabela 3:** Estudos selecionados, nos últimos oito anos, da utilização de epididimossomas ou caracterização deles.

Autor	Ano	Diluente	Aditivo	Espécie	Resultado
Reilly <i>et al.</i>	2016	OptiPrep	Epididimossoma	Camundongo	Caracterização dos mRNAs contidos nos epididimossomas, e seu papel na epigenética.
Oliveira <i>et al.</i>	2017	---	---	Humano	Discussão a respeito do papel dos epididimossomas na descendência do risco aumentado para Diabetes <i>melitus</i> .
Rowlisonet <i>al.</i>	2018	TRIS + Tween + leite em pó desnatado	Epididimossoma	Gato	Exposição de espermatozoides imaturos à epididimossomas resultou em uma melhor amostra.
Nixon <i>et al.</i>	2019	PBS	Epididimossoma	Camundongo	Caracterização da carga de proteínas.
Twenter <i>et al.</i>	2019	PBS	Epididimossoma	Equino	Caracterização do conteúdo de mRNA encontrados no epidídimo de equinos e suas funções.
Rowlisonet <i>al.</i>	2020	TRIS-HCl	Epididimossoma	Gato	Elucidação do tipo e quantidade de epididimossomas de gatos.
Rowlisonet <i>al.</i>	2021	TEST-gema	Epididimossoma	Gato	Exposição dos espermatozoides pós descongelamento também melhorou a funcionalidade celular,
Domingues <i>et al.</i>	2021	BeltsvilleThawingSolution	Epididimossoma	Zebrafish	A super excreção de hormônio do crescimento alterou o conteúdo de mRNA dos epididimossomas, reduzindo o potencial reprodutivo dos indivíduos.
Barrachina <i>et al.</i>	2022	PBS	Epididimossoma	Humano e camundongo	Caracterização e comparação dos epididimossomas encontrados em humanos e camundongos.
Dlamini <i>et al.</i>	2023	PBS	Epididimossoma	Javali	Comparação do conteúdo de mRNA de epididimossomas de javalis com bons parâmetros espermáticos, e parâmetros indesejáveis.

Os mRNAs presentes em epididimossomas secretados na cauda do epidídimo parecem estar envolvidos no resgate de embriões que exibem desenvolvimento defeituoso, por exemplo. Esse resgate foi estudado e revelou que embriões provindos de espermatozoides da cabeça do epidídimo não poderiam suportar o desenvolvimento embrionário de maneira tão eficiente quanto os provenientes da cauda (SHARMA *et al.*, 2018), porém, ao serem expostos à mRNA advindo da cauda do epidídimo, a taxa de

letalidade foi suprimida (CONINE *et al.*, 2018). Também já foi comprovado que a co-incubação destas células com epididimossomas aumentou a taxa de espermatozoides contendo cenexina, ou seja, obtiveram resultados superiores (ROWLISON *et al.*, 2018).

Características dos epididimossomas foram estudadas com maior diligência em humanos, touros, ratos e camundongos (PAUL *et al.*, 2021), porém já foram realizados estudos quanto a seus benefícios em diversas espécies (Tabela 3). Em outras palavras: a exposição das células reprodutivas masculinas à essas vesículas extracelulares melhoram a taxa de fertilização e a capacitação da progênie, uma vez que estas irão se ligar à membrana plasmática e influenciar processos bioquímicos e moleculares que visam não apenas capacitar e proteger estas células, como também melhorar as chances de sobrevivência da progênie, desde a implantação uterina até alterações epigenéticas causadas pela injeção de mRNAs.

## CONCLUSÃO

O manejo laboratorial de células reprodutivas gera estressores que necessitam ser contornados, não apenas de forma a gerar um melhor descongelamento da amostra, mas também de modo a garantir uma progênie o mais saudável possível. Nesta revisão, procuramos abranger dois diluidores e um aditivo que vêm sendo pouco testados, mas possuindo de forma geral um ótimo desempenho. Tanto o TEYP como o TRIS-mel se mostraram capazes de proteger os espermatozoides do dano causado pelo frio, especialmente no DNA, e estudos parecem indicar que podem ser utilizados em conjunto com sucesso. Os epididimossomas possuem uma extração complexa, porém são excelentes aliados não apenas para resguardar o esperma, mas também devido a seus diversos mecanismos que garantem um melhor desempenho espermático, especialmente quando nos referimos à utilização de células imaturas.

## REFERÊNCIAS

ABDELHAFEZ, F.; MAHFOUZ, R.; FAWZY, M.; EL-HALAWANI, H.; RAVICHANDRAN, J.; CAMEY, S.. Techniques for cryopreservation of individual or small numbers of human spermatozoa: a systematic review. **Human Reproduction Update**, v.15, n.2, p.153-164, 2009.

ABINAWANTO, A.; PRATIWI, I. A. SULISTIADI, D.. **The effect of combination of methanol with several concentration of honey solution on sperm quality of botia Chromobotia macracanthus Bleeker 1852 after short-term storage at -80 °C**. 2019.

AITKEN, R. J.; JULIIS, G. N.; McLACHLAN, R. I.. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. **International Journal of Andrology**, v.32, n.1, p.46-56, 2009.

ALI HASSAN, H.; DOMAIN, G.; LUVONI, G. C.; CHAAYA, R.; VAN SOOM, A.; WYDOOGHE, E.. Canine and Feline Epididymal Semen-A Plentiful Source of Gametes. **Animals**, v.11, n.10, p.2961, 2021. DOI: <http://doi.org/10.3390/ani11102961>

ANTON, M.. Egg yolk: structures, functionalities, and processes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.93, n.12, p.2871-2880, 2013.

AURONGZEB, M.; AZIM, M. K.. Antimicrobial properties of natural honey: a review of literature. **Pak. J. Biochem. Mol. Biol**, v.44, n.3, p.118-124, 2013.

BAMBANG, N.; IKHSAN, M.; TENSISKA, S.; MAHANI, N.. Rheological Properties of Honey and its Application on Honey Flow Simulation through Vertical Tube. In: IOP CONFERENCE SERIES: EARTH AND ENVIRONMENTAL SCIENCE. **Proceedings**. 2019. p.12-41. DOI: <http://doi.org/10.1088/1755-1315/334/1/012041>

BANDAY, M. N.; LONE, F. A.; RASOOL, F.; RATHER, H. A.; RATHER, M. A.. Does natural honey act as an alternative to antibiotics in the semen extender for cryopreservation of crossbred ram semen?. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v.18, n.4, p.258, 2017.

BARRACHINA, F.; BATTISTONE, M.A.; CASTILLO, J.; MALLOFRÉ, C.; JODAR, M.; BRETON, S.; OLIVA, R.. Sperm acquire epididymis-derived proteins through epididymosomes. **Human Reproduction**, v.37, n.4, p.651-668, 2022. DOI: <http://doi.org/10.1093/humrep/deac015>

BELALA, R.; BRIAND-AMIRAT, L.; MARTINOT, A.; THORIN, C.;



- MICHAUD, S.; DESHERCES, S.; YOUNGS, C.R.; BENCHARIF, D.. A comparison of liquid and lyophilized egg yolk plasma to low density lipoproteins for freezing of canine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 8, p. 1131-1138, 2019. DOI: <http://doi.org/10.1111/rda.13476>
- BENSON, J. D.; WOODS, E. J.; WALTERS, E. M.; CRITSER, J. K.. The cryobiology of spermatozoa. **Theriogenology**, v.78, n.8, p.1682-1699, 2012. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.06.007>
- BERGERON, A.; MANJUNATH, P.. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, n.10, p.1338-1344, 2006. DOI: <http://doi.org/10.1002/mrd.20565>
- CASTRO, C. H.; DICHOSO, G. A.; LANDICHO, M. M.; SANGEL, P. P.. Honey or pineapple juice as extender components for Quezon native and Duroc boar semen at different storage temperatures. **Philippine Agricultural Scientist**, v.103, n.4, 2020.
- CHEEPA, F. F.; LIU, H.; ZHAO, G.. The Natural Cryoprotectant Honey for Fertility Cryopreservation. **Bioengineering**, v.9, n.3, p.88, 2022
- CHELUCCI, S.; PASCIU, V.; SUCCU, S.; ADDIS, D.; LEONI, G.G.; MANCA, M.E.; NAITANA, S.; BERLINGUER, F.. Soybean lecithin-based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. **Theriogenology**, v.83, n.6, p.1064-1074, 2015. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.12.012>
- CHUNG, E. L. T.; NAYAN, N.; NASIR, N. S. M.; HING, P. S. A.; RAMLI, S.; RAHMAN, M. H. A.; KAMALLUDIN, M. H.. Effect of honey as an additive for cryopreservation on bull semen quality from different cattle breeds under tropical condition. **J. Anim. Health Prod**, v.7, n.4, p.171-178, 2019. DOI: <http://doi.org/10.17582/journal.jahp/2019/7.4.171.178>
- CONINE, C. C.; SUN, F.; SONG, L.; PÉREZ, J. A. R.; RANDO, O. J.. Small RNAs Gained during Epididymal Transit of Sperm Are Essential for Embryonic Development in Mice. **Developmental Cell**, v.46, n.4, p.470-480, 2018. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.06.024>
- CORCINI, C. D.; GOULARTE, K. L.; BONGALHARDO, D. C.; LUCIA, T. J. R.; JARDIM, R. D.; VARELA JUNIOR, A. S.. Effect of egg yolk plasma on dog sperm cryopreservation. **Andrology**, v.48, n.1, p.114-115, 2015. DOI: <http://doi.org/10.1111/and.12411>
- DLAMINI, N.H.; NGUYEN, T.; GAD, A.; TESFAYE, D.; LIAO, S.F.; WILLARD, S.T.; RYAN, P.L.; FEUGANG, J. M.. Characterization of Extracellular Vesicle-Coupled miRNA Profiles in Seminal Plasma of Boars with Divergent Semen Quality Status. **International Journal of Molecular Sciences**, v.24, n.4, p.3194, 2023. DOI: <http://doi.org/10.3390/ijms24043194>
- DOMINGUES, W. B.; SILVEIRA, T. L. R.; NUNES, L. S.; BLODORN, E. B.; SCHNEIDER, A.; CORCINI, C. D.; VARELA JUNIOR, A. S.; ACOSTA, I. B.; KÜTTER, M. T.; GREIF, G.; ROBELLO, C.; PINHAL, D.; MARINS, L. F.; CAMPOS, V. F. G.H.. Overexpression alters spermatid cells microRNAome profile in transgenic zebrafish. **Frontiers in Genetics**, p.1712, 2021.
- DOI: <http://doi.org/10.3389/fgene.2021.704778>
- ELLIOTT, G. D.; WANG, S.; FULLER, B. J.. Cryoprotectants: a review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. **Cryobiology**, v.76, p.74-91, 2017.
- EL-NADY, I. A.; ZEIDAN, A.E.; EL-SHARABASSY, A.A.; MEKKAWY, M.Y.. Influence of Honey Addition As a Natural Energy Source On Cooled Camel Spermatozoa. **Al-Azhar Journal of Agricultural Research**, v.47, n.1, p.109-115, 2022.
- EL-SHESHTAWY, R. I.; EL-BADRY, D. A.; GAMAL, A.; EL-NATTAT, W. S.; ALMAATY, A. M. A.. Natural honey as a cryoprotectant to improve Arab stallion post-thawing sperm parameters. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v.5, n.4, p.331-334, 2016. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.apjr.2016.06.004>
- FATEHI, A. N.; BEVERS, M. M.; SCHOEVERS, E.; ROELEN, B. A. J.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. M.. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. **Journal of Andrology**, v.27, n.2, p.176-188, 2006. DOI: <http://doi.org/10.2164/jandrol.04152>
- FERNÁNDEZ-GONZALEZ, R.; MOREIRA, P. N.; CRESPO, M. P.; MARTÍN, M. S.; RAMIREZ, M. A.; PERICUESTA, E.; BILBAO, A.; ALVAREZ, P. B.; HOURCADE, J. D.; FONSECA, F. R.; ADÁN, A. G.. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. **Biology of reproduction**, v.78, n.4, p.761-772, 2008. DOI: <http://doi.org/10.1095/biolreprod.107.065623>
- GAO, D.; CRITSER, J. K.. Mechanisms of cryoinjury in living cells. **ILAR journal**, v.41, n.4, p.187-196, 2000.
- GERVASI, M. G.; VISCONTI, P. E.. Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. **Andrology**, v.5, p.204-218, 2017.
- GÜNGÖR, Ş.; İNANÇ, M. E.; AKYÜZ, S.; ANDIL, ELIF.; ATA, A.. Does natural honey have beneficial effect on Honamlı buck semen during liquid storage?. **Eurasian Journal of Veterinary Sciences**, v.37, n.3, 2021.
- HAN, X.; CRITSER, J. K.. Measurement of the size of intracellular ice crystals in mouse oocytes using a melting point depression method and the influence of intracellular solute concentrations. **Cryobiology**, v.59, p.302-307, 2009. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.08.007>
- HERRICK, J. R.; WANG, C.; MACHATY, Z.. The effects of permeating cryoprotectants on intracellular free-calcium concentrations and developmental potential of in vitro-matured feline oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v.28, n.5, p.599-607, 2016.
- HEZAVEHEI, M.; SHARAFI, M.; KOUCHESFAHANI, H.M.; HENKEL, R.; AGARWAL, A.; ESMAEILI, V.; SHAHVERDI, A.. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches **Reproductive Biomedicine**, v.37, n.3, p.327-339, 2018. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012>

HOLT, W. V.. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, n.1-3, p.3-22, 2000.

KANDIEL, M. M. M.; ELKHAWAGAH, A. R. M.. Effect of honey supplementation on Egyptian buffalo semen. **Animal Reproduction**, v.14, n.4, p. 1103-1109, 2018 DOI: <http://doi.org/10.21451/1984-3143-AR891>

KWAKMAN, P. H. S.; ZAAT, S. A. J.. Antibacterial components of honey. **IUBMB life**, v.64, n.1, p.48-55, 2012.

LAN, Q.; XIE, Y.; PAN, J.; CHEN, Q.; XIAO, T.; FANG, S.. The Antibacterial and Antioxidant Roles of Buckwheat Honey (BH) in Liquid Preservation of Boar Semen. **Bio Med Research International**, v.2, 2021. DOI: <http://doi.org/10.1155/2021/5573237>

LIANG, S.; YUAN, B.; JIN, Y. X.; ZHANG, J. B.; BANG, J. K.; KIM, N. H.. Effects of antifreeze glycoprotein 8 (AFGP8) supplementation during vitrification on the in vitro developmental capacity of expanded bovine blastocysts. **Reproduction, Fertility and Development**, v.29, n.11, p.2140-2148, 2017. DOI: <http://doi.org/10.1071/RD16426>

MAIDIN, M. S.; PADLAN, M. H.; AZUAN, S. A. N.; JONIT, R.; MOHAMMED, N. H.; ABDULLAH, R.. Supplementation of Nigella sativa oil and honey prolong the survival rate of fresh and post-thawed goat sperms. **Tropical Animal Science Journal**, v.41, n.2, p.94-99, 2018.

MEHDIPOUR, M.; DAGHIGH, K.I.A.H.; MOGHADDAM, G.; HAMISHEHKAR, H.. Effect of egg yolk plasma and soybean lecithin on rooster frozen-thawed sperm quality and fertility. **Theriogenology**, v.116, p.89-94, 2018. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.05.013>

MÉNÉZO, Y.; DALE, B.; COHEN, M.. DNA damage and repair in human oocytes and embryos: a review. **Zygote**, v.18, n.4, p.357-365, 2010.

MORTAZAVI, S.-H.; ESLAMI, M.; FARROKHI-ARDABILI, F.. Comparison of different carrier-compounds and varying concentrations of oleic acid on freezing tolerance of ram spermatozoa in tris-citric acid-egg yolk plasma semendiluent. **Animal Reproduction Science**, v.219, 2020.

MUCHLISIN, Z. A.; NADIAH, W. N.; SITI AZIZAH M. N.. Exploration of natural cryoprotectants for cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus*, Burchell 1822 (Pisces: Clariidae) spermatozoa. **Czech Journal of Animal Sciences**, v.60, n.1, p.10-15, 2015.

MUKAIDA, T.; OK, C.. Vitrificação de ovócitos, embriões e blastocistos. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynecology**, v.26, n.6, p.789-803, 2012.

NANGIA, A. K.; KRIEG, S. A.; KIM, S. S.. Clinical guidelines for sperm cryopreservation in cancer patients. **Fertility and sterility**, v.100, n.5, p.1203-1209, 2013

NASREEN, S.; AWAN, M. A.; UL-HUSNA, A.; RAKHA, B. A.; ANSARI, M. S.; HOLT, W.; AKHTER, S.. Honey as an Alternative to Antibiotics for Cryopreservation of Nili-Ravi Buffalo Bull Spermatozoa. **Biopreservation and Biobanking**, v.18, n.1, p.25-32, 2020. DOI: <http://doi.org/10.1089/bio.2019.0054>

NAYIK, G. A.; DAR, B. N.; NANDA, V.. Physico-chemical, rheological and sugar profile of different unifloral honeys from Kashmir valley of India. **Arabian Journal of Chemistry**, v.12, n.8, p.3151-3162, 2019.

NEVES, C. F. I. B.. **Criopreservação embrionária e neuro desenvolvimento infantil**. Tese (Doutorado em Bioética) - Universidade Católica Portuguesa, 2016.

NIXON, B.; JULIUS, G. N.; HART, H. M.; ZHOU, W.; MATHE, A.; BERNSTEIN, I. R.; ANDERSON, A. L.; STANGER, S. J.; BYRNE, D. A. S.; JAMALUDDIN, M. F. B.; ALMAZI, J. G.; BROMFIELD, E. G.; LARSEN, M. R.; DUN, M. D.. Proteomic Profiling of Mouse Epididymosomes Reveals their Contributions to Post-testicular Sperm Maturation. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.18, p.S91-S108, 2019. DOI: <http://doi.org/10.1074/mcp.RA118.000946>

NUSBAUMER, D.; CUNHA, L. M.; WEDEKIND, C.. Sperm cryopreservation reduces offspring growth. **Proceedings of the Royal Society B**, v.286, n.1911, e.20191644, 2019.

OLIVEIRA, P. F.; CRISÓSTOMO, L.; SOUSA, M.; MONTEIRO, M. P.; MACEDO, P.; RAPOSO, J.; ALVES, M. G.. O papel do Espermatozoide na Transmissão à Descendência do Risco para Diabetes Mellitus. **Revista Portuguesa de Diabetes**, v.12, n.4, p.149-158, 2017.

PANAHI, F.; NASLAJI, A. N.; SEYEDASGARI, F.; ARAROOTI, T.; RAZAVI, K.; MOVAHEDDI, A. A. M.. Supplementation of tris-based extender with plasma egg yolk of six avian species and camel skim milk for chilled preservation of dromedary camel semen. **Animal Reproduction Science**, v.184, p.11-19, 2017. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.06.008>

PAUL, N.; TALLURI, T. R.; NAG, P.; KUMARESAN, A.. Epididymosomes: A potential male fertility influencer. **Andrologia**, v.53, n.9, e.14155, 2021. DOI: <http://doi.org/10.1111/and.14155>

PERUMAL, P.; SRIVASTAVA, S. K.; GHOSH, S. K.; BARUAH, K. K.; BAG, S.; RAJORIA, J. S.; KUMAR, K.; RAJKHOWA, C.; PANDE, M.; SRIVASTAVA, N.. Effects of low-density lipoproteins as additive on quality parameters and oxidative stress following cryopreservation of mithun (*Bos frontalis*) spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v.51, n.5, p.708-716, 2016. DOI: <http://doi.org/10.1111/rda.12735>

PINI, T.; RICKARD, J. P.; LEAHY, T.; CROSSETT, B.; DRUART, X.; GRAAF, S. P.. Cryopreservation and egg yolk medium alter the proteome of ram spermatozoa. **Journal of Proteomics**, v.181, p.73-82, 2018. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.04.001>

QUINN, P. J.; CHOW, P. Y. W.; WHITE, I. G.. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. **Reproduction**, v.60, n.2, p.403-407, 1980.

REILLY, J. N.; MCLAUGHLIN, E. A.; STANGER, S. J.; ANDERSON, A. L.; HUTCHEON, K.; CHURCH, K.; MIHALAS, B. P.; TYAGI, S.; HOLT, J. E.; EAMENS, A. L.; NIXON, B.. Characterisation of mouse epididymosomes reveals a complex profile of microRNAs and a potential mechanism for modification of the sperm epigenome. **Scientific Reports**, v.6, n.1, p.1-15, 2016. DOI:

<http://doi.org/10.1038/srep31794>

ROWLISON, T.; CLELAND, T. P.; OTTINGER, M. A.; COMIZZOLI, P.. Novel proteomic profiling of epididymal extracellular vesicles in the domestic cat reveals proteins related to sequential sperm maturation with differences observed between normospermic and teratospermic individuals. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.19, n.12, p.2090-2104, 2020. DOI:

<http://doi.org/10.1074/mcp.RA120.002251>

ROWLISON, T.; OTTINGER, M. A.; COMIZZOLI, P.. Exposure to epididymal extracellular vesicles enhances immature sperm function and sustains vitality of cryopreserved spermatozoa in the domestic cat model. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.38, n.8, p.2061-2071, 2021.

ROWLISON, T.; OTTINGER, M. A.; COMIZZOLI, P.. Key factors enhancing sperm fertilizing ability are transferred from the epididymis to the spermatozoa via epididymosomes in the domestic cat model. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v.35, n.2, p.221-228, 2018.

SANTO, M.; TAROZZI, N.; NADALINI, M.; BORINI, A.. Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. **Advances in Urology**, v.2012, p.854837, 2012. DOI:

<http://doi.org/10.1155/2012/854837>

SARMADI, F.; KAZEMI, P.; TIRGAR, P.; FAYAZI, S.; ESFANDIARI, S.; SOTOODEH, L.; MOLAEIAN, S.; DASHTIZAD, M.. Using natural honey as an anti-oxidant and thermodynamically efficient cryoprotectant in embryo vitrification. **Cryobiology**, v.91, p.30-39, 2019. DOI:

<http://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.11.001>

SHAH, S. A. H.; ANDRABI, S. M. H.; AHMED H.; QURESHI I. Z.. Chicken egg yolk plasma in tris-citric acid extender improves the quality and fertility of cryopreserved water buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. **Theriogenology**, v.89, p.32-40, 2017. DOI:

<http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.10.009>

SHAHVERDI, A.; SHARAFI, M.; GOURABI, H.; YEKTA, A. A.; ESMAEILI, V.; SHARBATOGHLI, M.; JANZAMIN E.; HAJNASROLLAHI, M.; MOSTAFAYI, F.. Fertility and flow cytometric evaluations of frozen-thawed rooster semen in cryopreservation medium containing low-density lipoprotein. **Theriogenology**, v.83, n.1, p.78-85, 2015. DOI:

<http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.07.044>

SHARMA, U.; SUN, F.; CONINE, C. C.; REICHHOLF, B.; KUKREJA, S.; HERZOG, V. A.; AMERES, S. L.; RANDO, O. J.. Small RNAs Are Trafficked from the Epididymis to Developing Mammalian Sperm. **Developmental Cell**, v.46, n.4, p.481-494, 2018. DOI:

<http://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.06.023>

SILVA, A. R.. **Criopreservação do sêmen canino diluído em**

**tris: avaliação morfológica, funcional e de suas interações com oócitos homólogos.** Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 2005.

SINGH, B.; KAUR, D.; SINGLA, M.; CHEEMA, R. S.; SETHI, A. P. S.; SINGHAL, S.; MALIK, D. S.. Effects of Egg Yolk and Egg Yolk Plasma Tris-Base Extenders on Beetal Buck Semen Preservation. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.**, v.9, n.11, p.1853-1864, 2020. DOI:

<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.911.219>

TWENTER, H.; KLOHONATZ, K.; DAVIS, K.; BASS, L.; COLEMAN, S. J.; BOUMA, G. J.; BRUEMMER, J. E.. Transfer of MicroRNAs From Epididymal Epithelium to Equine Spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.87, e.102841, 2020. DOI:

<http://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.102841>

URREGO, R.; OSORIO, N. R.; NIEMANN, H.. Epigenetic disorders and altered gene expression after use of assisted reproductive technologies in domestic cattle. **Epigenetics**, v.9, n.6, p.803-815, 2014.

VALCARCE, D. G.; GARCÍA, F. C.; RIESCO, M. F.; HERRÁEZ, M. P.; ROBLES, V.. Analysis of DNA damage after human sperm cryopreservation in genes crucial for fertilization and early embryo development. **Andrology**, v.1, n.5, p.723-730, 2013. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00116.x>

VALIPOUR, J.; NASHTAEI, M.S.; KHOSRAVIZADEH, Z.; MAHDAVINEZHAD, F.; NEKOONAM, S.; ESFANDYARI, S.; AMIDI, F.. Effect of sulforaphane on apoptosis, reactive oxygen species and lipids peroxidation of human sperm during cryopreservation. **Cryobiology**, v.99, p.122-130. 2021. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.11.012>

YIMER, N.; MUHAMMAD, N.; SARSAIFI, K.; ROSNINA, Y.; WAHID, H.; KHUMRAN, A.M.; KAKA, A.. Effect of honeys upplementation into Tris Extender on Cryopreservation of Bull Spermatozoa. **Malaysian Journal of Animal Science**, v.18, n.2, p.47-54, 2015.

ZHANG, W.; YI, K.; CHEN, C.; HOU, X.; ZHOU, X.. Application of antioxidants and centrifugation for cryopreservation of boar spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.132, n.3-4, p.123-128, 2012. DOI:

<http://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.05.009>

ZINI, A.; BOMAN, J. M.; BELZILE, E.; CIAMPI, A.. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. **Human Reproduction**, v.23, n.12, p.2663-2668, 2008.

ZOHEIR, K. M.; HARISA, G. I.; SALEM, O. M. A.; AHMAD, S. F.. Honey bee is a potential antioxidant against cyclophosphamide-induced genotoxicity in albino male mice. **Pak. J. Pharm. Sci.**, v.28, n.3, p.973-981, 2015.

Os autores detêm os direitos autorais de sua obra publicada. A CBPC – Companhia Brasileira de Produção Científica (CNPJ: 11.221.422/0001-03) detêm os direitos materiais dos trabalhos publicados (obras, artigos etc.). Os direitos referem-se à publicação do trabalho em qualquer parte do mundo, incluindo os direitos às renovações, expansões e disseminações da contribuição, bem como outros direitos subsidiários. Todos os trabalhos publicados eletronicamente poderão posteriormente ser publicados em coletâneas impressas ou digitais sob coordenação da Companhia Brasileira de Produção Científica e seus parceiros autorizados. Os (as) autores (as) preservam os direitos autorais, mas não têm permissão para a publicação da contribuição em outro meio, impresso ou digital, em português ou em tradução.