UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

GISELE MOURO RAVAGNANI

Avaliação dos efeitos da congelação do sêmen suíno
em diferentes concentrações na palheta de 0,5 ml
em relação às características de motilidade,
integridade das membranas espermáticas
e peroxidação lipídica

PIRASSUNUNGA
2015

GISELE MOURO RAVAGNANI

Avaliação dos efeitos da congelação do sêmen suíno em diferentes concentrações na palheta de 0,5 ml em relação às características de motilidade, integridade das membranas espermáticas e peroxidação lipídica

Pirassununga

2015

GISELE MOURO RAVAGNANI

**Avaliação dos efeitos da congelação do sêmen suíno em diferentes concentrações na
palheta de 0,5 ml em relação às características de motilidade, integridade das membranas
espermáticas e peroxidação lipídica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. André Furugen Cesar de Andrade

De acordo: _____

André Cesar de Andrade
Orientador

Pirassununga
2015

Nº CLASSIFICAÇÃO
Nº TOMBO 033984

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3142
FMVZ

Ravagnani, Gisele Mouro

Avaliação dos efeitos da congelação do sêmen suíno em diferentes concentrações na palheta de 0,5 ml em relação às características de motilidade, integridade das membranas espermáticas e peroxidação lipídica / Gisele Mouro Ravagnani. – 2015.
103 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, Pirassununga, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. André Furugen Cesar de Andrade.

1. Espermatozoide suíno. 2. Criopreservação. 3. Crioinjúria. 4. Concentração espermática. 5. Criocapacitação. I. Título.

São Paulo, 03 de julho de 2014

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação dos efeitos da congelação do sêmen suíno em diferentes concentrações na palheta de 0,5mL em relação à motilidade, integridade das membranas espermáticas e peroxidação lipídica.", protocolado sob o CEUA nº 6888200314, utilizando 5 Suínos (5 machos), sob a responsabilidade de André Furugen Cesar De Andrade, foi aprovado na reunião de 07/05/2014, e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Assessment of the effects of freezing of boar semen at different concentrations in 0.5 mL palette regarding motility and integrity of sperm membranes and lipid peroxidation.", protocol number CEUA 6888200314, utilizing 5 Swines (5 males), under the responsibility André Furugen Cesar De Andrade, was approved in the meeting of day 05/07/2014, and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: RAVAGNANI, Gisele Mouro

Título: **Avaliação dos efeitos da congelação do sêmen suíno em diferentes concentrações na palheta de 0,5 ml em relação às características de motilidade, integridade das membranas espermáticas e peroxidação lipídica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico à minha Mãe
Às minhas irmãs, Aline e Heloísa
E ao Thiago.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de viver, por todas as graças concedidas, por ter me guiado, abençoado e iluminado. E por sempre guardar o melhor para mim, mesmo que às vezes eu discorde.

A minha querida Mãe, Rose, por todo amor, carinho e dedicação. Pelo apoio. Por ser meu porto seguro, meu orgulho, meu melhor e maior exemplo!!

As minhas irmãs e cunhado, Heloísa, Aline e Everton, pelo apoio, incentivo e carinho.

Ao Thiago, pelo companheirismo, amizade, paciência e confiança. Obrigada por toda sua compreensão. Sou muito feliz ao seu lado, meu amor.

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Furugen Cesar de Andrade, pela oportunidade, conhecimento a mim cedido, compreensão, confiança, ética e por ter acreditado em mim.

A Dra. Simone, pela paciência, prontidão e fundamental colaboração durante todo o meu Mestrado.

Ao Professor Dr. Aníbal Sant'Anna Moretti, pela confiança e ensinamentos.

A Professora Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini, pelo apoio e confiança depositada em mim antes mesmo do meu ingresso na Pós graduação.

Ao Professor Dr. Rubens Paes de Arruda, pelo exemplo a ser seguido, pela confiança e empréstimo da máquina de congelamento de sêmen durante a execução deste experimento.

Ao Professor Dr. Carlos Henrique Cabral Viana, pelos ensinamentos, incentivo, amizade, paciência e bom humor. Você é um dos grandes responsáveis por eu estar aqui hoje.

Aos Professores Doutores, **Marcílio Nichi e Fabiana Bressan**, por terem aceitado o convite de membro suplente da banca de defesa deste trabalho.

Aos colegas de equipe do LATES, Mariana, Diego, Melissa, Victor, Gustavo e Bruno, pela convivência e colaboração nos experimentos.

A Mariana Torres, por toda a ajuda durante meu Mestrado.

Ao Diego (Gato Seco), pela amizade e por nunca medir esforços para me ajudar.

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisa em Suínos, Fabinho, Marcão, Chiquinho, Ricardão e Suelen por toda a colaboração, paciência, agradável convivência e aprendizado.

Aos amigos do Departamento de Reprodução Animal, Dani, Moana, Maíra (Doce), Milena, Renata, Mari (Mário), Shirley, Fernanda (Bú), Bruna, Saara, Angela, Estela, Roberta, Henrique, Kleber, Milton, Roney, Ticiano, Thiago, Danilo (Baiano), Leonardo (Bati), Everton, Gabriel, muito obrigada pela agradável convivência.

Aos demais Professores do Departamento de Reprodução Animal, pelos ensinamentos e agradável convivência

Aos funcionários do CBRA, pela organização, limpeza e dedicação.

A Harumi D. Shiraishi, por sempre atender e sanar as minhas dúvidas.

A Elza Faquim, pela agilidade e qualidade no trabalho.

A Fundação de Amparo a Pesquisa, FAPESP, pelo apoio financeiro, antes mesmo do mestrado, durante o meu período como bolsista de Treinamento Técnico III vinculado ao processo número: 2012/15087-1 e do processo número 2011/23484-8.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela bolsa de estudo cedida à mim, durante todo o meu Mestrado.

E por último, mas não menos importantes, aos cachacos **Luisinho, Hugo, Zé, Heitor, Homero e Mariano**. Serei eternamente agradecida pelo aprendizado, convivência e paciência. Guardo-os no coração, para sempre!

**“A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original.”**

Albert Einstein

RESUMO

RAVAGNANI, G. M. **Avaliação dos efeitos da congelação do sêmen suíno em diferentes concentrações na palheta de 0,5 ml em relação às características de motilidade, integridade das membranas espermáticas e peroxidação lipídica.** [Assessment of the effects of freezing of boar semen in different concentrations in 0.5 ml straw in relation to the motility characteristics of the sperm integrity and membrane lipid peroxidation]. 2015. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

A ausência de trabalhos verificando a melhor concentração de espermatozoides para se congelar o sêmen de cachacos em palhetas de 0,5 mL, gerou a necessidade deste estudo. Foi proposto, por meio deste experimento, encontrar uma quantidade ideal, ou seja, uma concentração em que se consiga congelar o maior número de espermatozoides por palheta, sem aumentar os danos já causados pelo processo de criopreservação dos espermatozoides de cachacos. Diante disso, foram realizadas 5 coletas de 5 cachacos ($n=25$), utilizando apenas a fração rica do ejaculado. Estes foram divididos em cinco concentrações espermáticas diferentes, a saber: 100, 200, 300, 600 e 800×10^6 espermatozoides/mL e congelados em palhetas de 0,5mL. Após o processo de criopreservação, realizado por um sistema automatizado, as palhetas foram acondicionadas em botijão criogênico. Para as análises, 2 palhetas de cada concentração foram descongeladas em banho maria (37°C por 30 segundos) e submetido às avaliações das características de motilidade por meio do CASA, citometria de fluxo para a análise da integridade das membranas acrossomal e plasmática, potencial mitocondrial, peroxidação lipídica e fluidez da membrana espermática (capacitação), além da morfologia espermática por microscopia de contraste de interferência diferencial de fase. As variáveis avaliadas foram submetidas à análise de variância e ao teste de média PDDIF, ao nível de 5%. O aumento da concentração espermática, na palheta de 0,5mL, afetou significativamente ($p<0,05$) a motilidade total e progressiva, velocidade progressiva, velocidade de trajeto, linearidade, retilinearidade, frequência de batimento flagelar e hiperativação. O aumento do número de espermatozoides na palheta não alterou ($p>0,05$) a porcentagem de células que apresentavam simultaneamente a integridade das membranas plasmática e acrossomal e com potencial mitocondrial

(MIAIAP), o aumento não influenciou ($p>0,05$) as variáveis peroxidação lipídica, capacitação e morfologia espermática. Baseado nos resultados, pode-se sugerir a congelação de até 300×10^6 espermatozoides/mL, na palheta de 0,5 mL, sem maiores danos à motilidade e integridade das membranas espermáticas.

Palavras-chave: Espermatozoide suíno. Criopreservação. Crioinjúria. Concentração espermática. Criocapacitação.

ABSTRACT

RAVAGNANI, G. M. **Assessment of the effects of freezing of boar semen in different concentrations in 0.5 ml straw in relation to the motility characteristics of the sperm integrity and membrane lipid peroxidation.** [Avaliação dos efeitos da congelação do sêmen suíno em diferentes concentrações na palheta de 0,5 ml em relação às características de motilidade, integridade das membranas espermáticas e peroxidação lipídica]. 2015. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

The lack of studies verifying the best concentration of sperm to freeze the boar semen in 0.5 ml straws, bring forth necessity for this study. The experiment proposed to find an optimal amount, in other words a concentration that is possible to freeze the higher number of spermatozoa per straw without increasing the damage already caused by the process of cryopreservation of boar spermatozoa. Therefore, there were 5 semen collections of 5 boars ($n = 25$) using only the rich fraction of the ejaculate. They were divided into five different sperm concentrations, namely 100, 200, 300, 600 and 800×10^6 sperm/mL and frozen in 0.5 mL straw. After the cryopreservation process, carried out by an automated system, straws were placed in cryogenic cylinders. For the analysis, two straws of each concentration were thawed in water bath (37°C for 30 seconds) and subjected to evaluations of motility characteristics through CASA, flow cytometry to analyze the integrity of the acrosome and plasma membrane, mitochondrial potential, peroxidation and lipid fluidity of sperm membrane (capacitation), and the sperm morphology by phase differential interference contrast microscopy. The variables were subjected to analysis of variance and the average test PDDIF, at 5%. The increased sperm concentration, in the 0.5mL straw, affected significantly ($p < 0.05$) total and progressive motility, progressive velocity, path velocity, linearity, straightness, flagellar beat frequency and hyperactivation. The increase in the spermatozoa number, in 0,05 mL straw, did not change ($p > 0.05$) the percentage of cells that simultaneously showed the integrity of plasma and acrosomal membranes and with high mitochondrial potential (MIAIHM), the increase did not affect ($p > 0.05$) the lipid peroxidation variables, training and sperm morphology. Based on the results, it can be suggested to freeze with 300×10^6 spermatozoa/mL, in 0.5 mL straw, without major damage to the integrity and motility of the sperm membrane.

Keywords: Swine spermatozoa. Cryopreservation. Cryoinjury. Spermatid concentration. Cryo capacitation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema experimental das análises das amostras	47
Figura 2 -	Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos (LATES, FMVZ-USP)	49
Figura 3 -	Citômetro de Fluxo BDFACSAria®	50
Figura 4 -	Alojamento dos cachaços no Núcleo de Pesquisa em Suínos (FMVZ-USP)	51
Figura 5 -	Higienização do divertículo prepucial e coleta de sêmen através do método da mão enluvada.....	52
Figura 6 -	Determinação do volume ejaculado em béquer de 100mL.....	53
Figura 7 -	Contagem espermática através da utilização da câmara de Neubauer, aumento de 400x.....	54
Figura 8 -	Sistema de análise computadorizada do sêmen (SCA®, Microptic S.L., Barcelona, Espanha) instalado sobre um microscópio de epifluorescência (Nikon®, Modelo Eclipse NI-U) ...	55
Figura 9 –	Imagem gerada na tela do programa de análise computadorizada do sêmen pelo programa <i>Sperm Class Analyzer</i> (SCA®, Microptics S. L., Barcelona, Espanha)	55
Figura 10 –	Avaliação das características morfológicas através da microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) (Nikon®, modelo 80i)	56
Figura 11 –	Distribuição dos grupos experimentais e envase das palhetas de 0,5mL (IMV Internacional, St. Paul, Minnesota, USA)	58
Figura 12 –	Máquina de criopreservação automática do sêmen (TK 3000® compacta, TK Tecnologia em Congelação Ltda., Uberaba, Minas Gerais, Brasil)	58
Figura 13 –	Armazenamento das amostras de sêmen em botijão criogênico (MVE®, Minnesota, EUA)	59
Figura 14 –	Descongelamento das amostras de sêmen em banho-Maria a 37°C por 30 segundos.....	60

Figura 15 –	Gráficos gerados a partir do software FACSDiva 6.1, das análises de integridade de membranas plasmática e acrossomal e potencial mitocondrial na citometria de fluxo	62
Figura 16 –	Gráficos gerados a partir do software FACSDiva 6.1, da sonda de peroxidação lipídica e capacitação espermática na citometria de fluxo	64
Figura 17 -	Gráficos gerados a partir do software FACSDiva 6.1, da sonda de capacitação espermática na citometria de fluxo.....	66

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Média $\pm$ erro padrão das características da cinética espermática avaliadas pelo programa *Sperm Class Analyser* (SCA) de espermatozoides submetidos à criopreservação em cinco diferentes concentrações em palhetas de 0,5mL. As características analisadas foram motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade de curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %), amplitude lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimento flagelar (BCF, Hz) e hiperativação (%)69
- Tabela 2 - Média $\pm$ erro padrão das células MIAIAP (Membrana Íntegra Acrossomo Íntegro Alto Potencial Mitochondrial), MI (Membrana Plasmática Íntegra), AI (Acrossomo Íntegro), AP (Alto Potencial Mitochondrial) expressos em porcentagem (%), de espermatozoides suínos submetidos à criopreservação em cinco diferentes concentrações em palhetas de 0,5mL, avaliadas pela citometria de fluxo71
- Tabela 3 – Média $\pm$ erro padrão da peroxidação lipídica, medida em intensidade de fluorescência (a. u.), de espermatozoides suínos submetidos à criopreservação em cinco diferentes concentrações em palhetas de 0,5mL, avaliados pela citometria de fluxo72
- Tabela 4 – Média $\pm$ erro padrão da desordem lipídica, expressa em intensidade de fluorescência média (a. u.), de espermatozoides suínos submetidos à criopreservação em cinco diferentes concentrações em palhetas de 0,5mL, avaliados por citometria de fluxo.....73
- Tabela 5 – Média $\pm$ erro padrão das alterações morfológicas, expressas em porcentagem (%), de espermatozoides suínos submetidos à criopreservação em cinco diferentes concentrações em palhetas

de 0,5mL, avaliados por microscopia óptica de contraste de
interferência diferencial de fase.....74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL	microlitro
µm	micrômetro
AI	membrana acrossomal íntegra
ALH	amplitude lateral da cabeça
AMPc	adenosina monofosfato cíclica
AP	alto potencial de membrana mitocondrial
BCF	frequência batimento flagelar
CASA	<i>Computer Assited Sperm Analysis</i>
g	força centrífuga
H33342	Hoescht 33342
HIPER	hiperativação
Hz	Hertz
Kg	quilogramas
LIN	linearidade
mg	miligramas
mL	mililitro
MI	membrana plasmática íntegra
MIAIAP	membrana plasmática íntegra, acrossoma íntegro e alto potencial mitocondrial
MIARAP	membrana plasmática íntegra, acrossoma reagido e alto potencial mitocondrial
MIAIBP	membrana plasmática íntegra, acrossoma íntegro e baixo potencial mitocondrial
MIARBP	membrana plasmática íntegra, acrossoma reagido e baixo potencial mitocondrial
MLAIAP	membrana plasmática lesada, acrossoma íntegro e alto potencial mitocondrial
MLARAP	membrana plasmática lesada, acrossoma reagido e alto potencial mitocondrial

MLAIBP	membrana plasmática lesada, acrossoma íntegro e baixo potencial mitocondrial
MP	motilidade progressiva
MT	motilidade total
PI	membrana plasmática íntegra
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
SPTZ	espermatozoide
STR	retilinearidade
u. a.	unidade arbitrária
VAP	velocidade média do trajeto
VCL	velocidade curvilinear
VSL	velocidade progressiva

LISTA DE SÍMBOLOS

-	menos
%	por cento
/	por
<	menor
>	maior
=	igual
±	mais ou menos
®	marca registrada
°C	graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DE LITERATURA	26
2.1	CRIOPRESERVAÇÃO	26
2.2	CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN SUÍNO – FRAÇÃO TOTAL	28
2.3	CRIOPRESERVAÇÃO SÊMEN SUÍNO – FRAÇÃO RICA.....	30
2.4	CRIOINJÚRIAS ESPERMÁTICAS	31
2.5	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DA MEMBRANA ESPERMÁTICA	35
2.6	CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA	36
2.7	HIPERATIVAÇÃO	38
2.8	CONCENTRAÇÃO E VOLUME DE ARMAZENAMENTO DO SÊMEN CRIOPRESERVADO	40
3	HIPÓTESES.....	43
4	OBJETIVOS.....	45
5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	47
6	MATERIAL E MÉTODO	49
6.1	LOCAL E PERÍODO EXPERIMENTAL	49
6.2	ANIMAIS.....	50
6.3	COLETA E ANÁLISE DE SÊMEN PRÉ-CRIOPRESERVAÇÃO	51
6.3.1	Volume	52
6.3.2	Concentração espermática	53
6.3.3	Avaliação computadorizada das características do movimento espermático.....	54
6.3.4	Avaliação das características morfológicas pré-criopreservação	56
6.4	PREPARO E CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN	57

6.5	ANÁLISE DO SÊMEN PÓS-CRIOPRESERVAÇÃO	59
6.5.1	Avaliação computadorizada das características do movimento espermático.....	60
6.5.2	Avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e do potencial mitocondrial por citometria de fluxo	60
6.5.3	Avaliação da peroxidação lipídica por citometria de fluxo	62
6.5.4	Avaliação da estabilidade (fluidez) da membrana plasmática por citometria de fluxo	64
6.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	67
7	RESULTADOS	67
8	DISCUSSÃO	75
9	CONCLUSÃO	79
10	CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
	REFERÊNCIAS.....	83
	ANEXOS	94

1 INTRODUÇÃO

A inseminação artificial em suínos é conduzida quase que exclusivamente com sêmen suíno refrigerado entre 15 e 18°C, sendo este utilizado de 3 a 7 dias, proporcionando resultados de fertilidade semelhantes aos obtidos pelo uso da monta natural. Apesar de que haja evidências de que para alcançar a fertilidade o uso desse sêmen deve ser de até 48 horas após a coleta, utilizando diluidores de curta ou longa duração (JOHNSON et al., 1982; WABERSKI et al., 1994; BENNEMANN et al., 2005). Devido às dificuldades decorrentes da manutenção da temperatura de armazenamento e à limitação de sua utilização por um período máximo de 5 dias, novas metodologias têm sido estudadas para viabilizar o uso do sêmen refrigerado a 5° C, ou para aperfeiçoar o processo de congelação.

Em 2000, Johnson et al. estimaram que aproximadamente 19 milhões de inseminações em suínos foram realizadas no mundo, sendo que destas, menos de 1% envolviam o uso de sêmen congelado. A congelação do sêmen suíno permite a difusão e conservação de doses inseminantes de alto valor genético e apresenta-se como uma alternativa para as situações nas quais o transporte de animais e sêmen é restrito, além de controlar a propagação de doenças sexualmente transmissíveis. Por esses motivos o alcance do sucesso na criopreservação pode representar um importante avanço no sistema de produção de suínos (BAILEY et al., 2008; VELLOSO, 2011).

A criopreservação torna o período de uso desse sêmen muito maior, permitindo tempo suficiente para testes assegurando a ausência de patógenos e melhorando a biossegurança dos animais. A inseminação de fêmeas suínas com sêmen congelado normalmente resulta em menores taxas de partos e tamanho de leitegada do que quando utilizado o sêmen refrigerado (JOHNSON et al., 2000; ROCA et al., 2003). Vários fatores têm sido apontados como responsáveis pelos baixos resultados de fertilidade do sêmen suíno congelado, um deles é o processo de criocapacitação (BRAVO et al., 2005; VADNAIS; ROBERTS, 2007; ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2008).

A crioinjúria possivelmente diminui o tempo de vida desses espermatozoides modificando vias de regulação, causando diminuição na motilidade, danos na cromatina, alterações de membrana, diminuição de potencial mitocondrial e reação acrossômica causados pelo choque de temperatura e de osmolaridade. Soma-se a isso, a geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS) resultando em uma parte da população de espermatozoides incapaz de reagir à tuba uterina e fertilizar o oócito, sendo os espermatozoides suínos os mais sensíveis quando comparados ao de outras espécies (GREEN; WATSON, 2001; VADNAIS et al., 2005; VADNAIS et al., 2011).

Em suínos, o processo de criopreservação constitui-se de várias etapas como a coleta de sêmen, centrifugação, diluição, resfriamento e congelação. A centrifugação é um passo necessário para ser realizado antes da congelação quando coleta-se todo o ejaculado. A centrifugação facilita a remoção do plasma seminal, além de concentrar a população de espermatozoides para que eles possam ser rediluídos com diluidores de congelação. Pesquisadores indicam que para a criopreservação de sêmen suíno, são realizados uma variedade de protocolos de centrifugação onde os mais utilizados foram: 300g por 10 minutos (PURSEL; JOHNSON, 1975), 800g por 10 minutos, 800g por 15 minutos (PAQUIGNON; COUROT, 1976), e 1400g por 5 minutos (LARSSON et al., 1977). Sendo os dois primeiros a base para protocolos de criopreservação de sêmen suíno atualmente em vigor para uso comercial. Porém, com algumas modificações no método de coleta do sêmen é possível separar as diferentes frações do ejaculado, dispensando o processo de centrifugação, desde que se colete apenas a fração rica. Deste modo pode-se submeter o sêmen suíno diretamente ao processo de criopreservação (HU et al., 2008; JUAREZ et al., 2011; DIDION et al., 2013).

As mudanças biofísicas provocadas pela transição da água no estado líquido para gelo durante o resfriamento relativamente lento, usado na maioria dos protocolos, são as principais causas de danos à célula espermática. Durante a congelação, os espermatozoides são direcionados para canais de soluções não congeladas entre os cristais de gelo e estes canais tornam-se progressivamente mais estreitos com a diminuição da temperatura (MAZUR, 1984). Tais canais são importantes durante a criopreservação, pois segundo Amann e Pickett (1987) se 15 % da água extracelular é mantida não congelada, a possibilidade de sobrevivência da célula à congelação é maior.

Caso os espermatozoides fossem congelados apenas no plasma seminal (sêmen puro), a congelação se tornaria letal, pois haveria formação de gelo tanto dentro quanto fora da célula, danificando as estruturas essenciais, em especial a membrana plasmática e as mitocôndrias. Porém, quando o meio contém crioprotetores, muitas células irão sobreviver ao processo, mesmo com os danos ocorridos. Sob estas condições, o gelo se forma no meio da diluição, ao redor dos espermatozoides e, como os cristais de gelo crescem na água, que representa a maior parte deste meio extracelular, a quantidade de solvente diminui enquanto o soluto fica mais concentrado (RODRIGUEZ-MARTINEZ; WALLGREEN, 2011).

Para utilizar a inseminação artificial com o sêmen congelado é necessário a descongelação de várias palhetas para se atingir concentração inseminante, fato este que delonga o processo da inseminação artificial como um todo. Por isso, se torna interessante encontrar uma maior concentração espermática, que ocasione menos danos à célula, pois assim uma menor quantidade de palhetas serão necessárias para a produção da dose inseminante, tornando então, o processo de inseminação artificial com sêmen congelado mais rápido e eficiente.

Diante disso, é possível pressupor que com o aumento da concentração espermática ocorrerá também um aumento nos danos estruturais e funcionais da célula espermática, pois a quantidade de diluidor e espaço disponíveis para o espermatozoide diminuem à medida que a concentração aumenta. Soma-se a esse raciocínio a ausência de trabalhos verificando a melhor concentração de espermatozoides para se congelar o sêmen de cachacos em palhetas de 0,5mL. Deste modo, esse estudo foi proposto a fim de encontrar uma quantidade ideal, ou seja, uma concentração em que se consiga congelar o maior número de espermatozoides, por palheta, sem aumentar os danos já causados pelo processo de criopreservação dos espermatozoides de cachacos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A seguir, serão revisados alguns tópicos importantes, para uma melhor compreensão das possíveis alterações que podem ocorrer na célula espermática durante o processo de criopreservação do sêmen suíno, bem como as alterações nas características de motilidade e integridade das membranas espermáticas em cinco concentrações espermáticas, na palheta de 0,5mL.

2.1 CRIOPRESERVAÇÃO

A prática da congelação do sêmen suíno teve início na década de 1960 e sua fertilidade foi estudada por meio do uso da inseminação artificial cervical (BWANGA, 1991). A criopreservação do espermatozoide suíno para a comercialização é uma prática pouco utilizada quando comparada às outras espécies por razão da congelabilidade dos espermatozoides ser pior que a de outras espécies (JOHNSON et al., 1981, 2000; MAZUR et al., 2008) devido aos danos causados durante o processo da criopreservação, custo e o baixo número de doses por ejaculado (RODRIGUEZ-MARTINEZ; WALLGREEN, 2011). Foi relatado o alcance de altas taxas de concepção (70-80%) através da inseminação artificial pelo meio de diferentes protocolos de criopreservação (FISER; FAIRFULL, 1990; MEDRANO et al., 2002; KUMAR et al., 2003), novos meios de diluição (GUTIÉRREZ-PÉREZ et al., 2009) ou por novos métodos de inseminação, como por exemplo a inseminação intrauterina (ROCA et al., 2003, 2006; VAZQUEZ et al., 2008).

Como descrito por Thurston et al. (2002), a raça Landrace possuem maior frequência de animais considerados “bons congeladores” quando comparados aos animais das raças Large White e Duroc. Além do mais, é sabido que a qualidade do sêmen criopreservado e o sucesso nas taxas de inseminação são dependentes das características de cada cachão dentro de uma mesma raça (LARSSON et al., 1977; HERNANDEZ et al., 2007). Os valores de motilidade e viabilidade variam significativamente entre cachãos. Existem ainda variações na congelabilidade do

sêmen entre diferentes ejaculados de um mesmo animal (PEÑA; LINDE FOSBERG, 2000; ROCA et al., 2006).

Em 2007, Hernandez et al. constataram que a adição de plasma seminal de animais “bons congeladores” no sêmen de “maus congeladores” melhora a qualidade espermática após o descongelamento. Porém, de acordo com Eriksson et al. (2001), quando realizado o procedimento acima citado por longos períodos de incubação (mais de 20 horas) no sêmen fresco, foi constatada diminuição na motilidade após o descongelamento, o que sugere dependência das características do plasma seminal de cada cachão.

As mudanças biofísicas provocadas pela transição do estado da água, de líquido para gelo, que ocorrem durante o congelamento lento que é o mais utilizado, também causam danos na célula espermática. Se o ejaculado for congelado sem um diluidor de criopreservação ou apenas diluído em uma solução tampão haverá a formação de gelo nos meios extra e intracelular, danificando estruturas, particularmente a membrana plasmática e as mitocôndrias, o que é praticamente letal à célula. Esses danos ocorrem mesmo com a utilização de diluidores com crioprotetores mas, muitas células sobrevivem. Sob essas condições o gelo é formado no meio diluído e circunda o espermatozoide e, como os cristais de gelo crescem no meio livre de água que compõe esse meio extracelular, a quantidade de solvente diminui a medida que o soluto se concentra. O espermatozoide perde água do meio intracelular a fim de compensar o estresse osmótico conduzido pela desidratação celular consequente da congelação. Eventualmente quando a temperatura está abaixo de -80°C , quanto maior a concentração, maior a viscosidade das soluções intra e extracelular, evento que os tornam em uma matriz vítrea metaestável, a qual é mantida quando o espermatozoide está armazenado a -196°C (em nitrogênio líquido). É durante a descongelação que as células espermáticas são lesadas, quando as membranas e axonemas são deteriorados pelo desbalanço osmótico (RODRIGUEZ-MARTINEZ; WALLGREEN, 2011).

A membrana plasmática é o primeiro local a sofrer os danos causados pela criopreservação (HAMMERSTEDT et al., 1990; PARKS; GRAHAM, 1992; WATSON, 1995). Análises criomicroscópicas com o uso de um marcador para a integridade da membrana plasmática em espermatozoide de carneiro comprova a afirmação

acima, indicando que a exposição a baixas temperaturas seguida do descongelamento danifica principalmente a membrana plasmática e em seguida a peça intermediária e acrossoma (HOLT; NORTH, 1994).

Para a realização da congelação do sêmen de suíno existem duas alternativas, a congelação da fração total ou rica do ejaculado.

2.2 CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN SUÍNO – FRAÇÃO TOTAL

As etapas do processo de congelamento foram avaliadas por diversos pesquisadores, entre elas estão as taxas de resfriamento e aquecimento, choque térmico e o tempo de espera durante o resfriamento, os crioprotetores e sua concentração, além das formas de envase (BWANGA, 1991; HOLT, 2000; JOHNSON et al., 2000; WATSON, 2000). No entanto, muito pouca atenção tem sido dada à etapa de centrifugação, fase em que os espermatozoides são submetidos antes de serem congelados. Em suínos, a centrifugação é um passo necessário para ser realizada antes da congelação. A centrifugação facilita a remoção do plasma seminal, além de concentrar a população de espermatozoides para que eles possam ser rediluídos com diluidores de congelação. Alguns estudos apontam que na criopreservação de sêmen suíno, são realizados uma variedade de protocolos de centrifugação onde os mais utilizados foram: 300 g por 10 minutos (PURSEL; JOHNSON, 1975), 800 g por 10 minutos, 800 g por 15 minutos (PAQUIGNON; COUROT, 1976), e 1400 g por 5 minutos (LARSSON, EINARSSON, 1977). Sendo os dois primeiros a base para protocolos de criopreservação de sêmen suíno atualmente em vigor para uso comercial.

A criopreservação de espermatozoides suínos com os métodos atuais traz prejuízos visto que existe uma redução significativa na quantidade de espermatozoides viáveis, geralmente mais de 50% não sobrevivem ao processo de congelação-descongelação (ALMLID; HOFMO, 1996). Esta queda é devido as alterações da temperatura e da manipulação de espermatozoides, que ocorrem

durante a centrifugação. A explicação para esta questão é que a centrifugação causa dois problemas: 1) a perda de espermatozoides devido a remoção do sobrenadante (KATKOV; MAZUR, 1998), e 2) danos físicos causados à população de espermatozoides (ALVAREZ et al., 1993).

Vários autores relatam que a sobrevivência e a motilidade do espermatozoide refrigerado aumentam com a remoção do plasma seminal, e um número de proteínas do plasma seminal foram identificadas como uma das causas da sobrevivência reduzida e perda da motilidade no sêmen bovino (WISHWANATH et al., 1992) e caprino (PELLICERRUBIO; COMBARNOUS, 1998). Estas proteínas entram em contato com os espermatozoides durante a ejaculação, interagem com a membrana dos espermatozoides e influenciam em diferentes características, incluindo a motilidade (BRAUN et al., 1994). Serres et al. (2002) analisando o sêmen de jumentos, obtiveram resultados mais elevados para sêmen centrifugado que para o sêmen não centrifugado, em relação a motilidade total e progressiva. Por outro lado, tem sido demonstrado para várias espécies como em ratos e humanos (NG et al., 1990), e camundongos (KATKOV; MAZUR, 1998) que a centrifugação é um passo potencial nos danos aos espermatozoides durante o processamento do sêmen.

Diversos trabalhos avaliando o efeito de diferentes regimes de centrifugação foram descritos para o sêmen humano (SHEKARRIZ et al., 1995), equino (REVELL et al., 2002) e suínos (CARVAJAL et al., 2004). Alguns pesquisadores identificaram que o regime de centrifugação tem efeito sobre a perda de espermatozoides e, portanto, influencia na recuperação dos mesmos. Usando menor força G e menores tempos de centrifugação (800 e 400 g por 3 minutos) obteve-se uma menor recuperação de espermatozoides, por causa de uma formação incompleta do pellet e, conseqüentemente, a perda de células não pelletizadas após a remoção do sobrenadante. Em contraste, o uso de mais força G e de tempos mais longos de centrifugação (2400 e 1600 g por 5 minutos) levou à sedimentação de uma maior quantidade de espermatozoides. Além disso, a porcentagem de espermatozoides recuperados obtidos com este regime permaneceu praticamente inalterada com o uso maior da força G e tempo de centrifugação reduzida (2400 g por 3 minutos) (CARVAJAL et al., 2004).

De acordo com os autores acima citados concluíram que o tempo de centrifugação é mais crítico que a força G utilizada, para indução de danos ao espermatozoide, portanto, o uso da centrifugação por curtos períodos é recomendado no preparo do sêmen para técnicas de reprodução assistida

2.3 CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN SUÍNO – FRAÇÃO RICA

O método de coleta tradicional, o da mão enluvada, em suínos permite separar as diferentes frações do ejaculado. Embora alguns protocolos de criopreservação utilizem o ejaculado total (GUTIÉRREZ-PÉREZ et al., 2009; BREINGER et al., 2011; RINGWELSKI et al., 2013), a fração rica é usualmente a única fração coletada para se realizar o processo de criopreservação (HU et al., 2008; JUAREZ et al., 2011; DIDION et al., 2013).

Em suínos é possível distinguir três frações no ejaculado, resultantes da atividade testicular e epididimária, também como de diferentes secreções oriundas das glândulas sexuais acessórias (GARNER; HAFEZ, 1996; CÓRDOVA-IZQUIERDO et al., 2004; PEÑA et al., 2006). As frações são as seguintes: 1- Fração pré-espermática, formada por secreções provenientes da próstata, glândulas vesiculares e glândulas bulbouretrais, com volume de cerca de 10 - 15 mL. Esta fração não contém espermatozoides e normalmente apresenta aparência clara ou transparente; 2- Fração rica em espermatozoides, com volume podendo variar de 70 a 100mL e assim, apresentando coloração de aspecto branco-leitoso. Esta apresenta alta concentração espermática, variando de 0,5 a 1×10^9 espermatozoides/mL e contém secreções produzidas pelas glândulas vesiculares e próstata; 3- Fração pós-espermática, com volume variando de 150-200 mL e poucos espermatozoides. Apresenta aspecto soroso e concentração menor que 1×10^6 de espermatozoides/mL. Além disso, uma secreção de consistência gelatinosa oriunda das glândulas bulbouretrais é encontrada nessa fração. Outra característica da mesma é a presença de grande quantidade de plasma seminal. Considerando-se que a porcentagem de espermatozoides viáveis é um fator importante para o sucesso da fertilização (BONET et al., 1995; PINART et al., 1999).

2.4 CRIOINJÚRIAS ESPERMÁTICAS

O sêmen criopreservado dos mamíferos é usualmente conhecido por ter o potencial de fertilidade prejudicado em relação ao sêmen fresco. São inúmeros os motivos pelos quais existe essa diminuição da fertilidade. Em outras espécies, mais espermatozoides são necessários para se alcançar uma fertilidade razoável, e as perdas associadas à criopreservação podem chegar a impossibilidade de comercialização. Entre 40-50 % dos espermatozoides não sobrevivem ao processo de criopreservação nem mesmo com os melhores protocolos (WATSON, 1995).

A criopreservação possui várias etapas que podem danificar os espermatozoides tais como: a mudança da temperatura, o estresse osmótico e tóxico causado pela exposição aos crioprotetores e a formação e dissolução de gelo no ambiente extracelular, assim, para que ocorra a união dos gametas, o espermatozoide deve manter condições básicas, como: metabolismo para a produção de energia, motilidade progressiva, integridade acrossomal e integridade das proteínas de membrana, a ligação com o gameta feminino e, finalmente, a fertilização. Os danos que os espermatozoides sofrem durante este processo podem ser ultra-estruturais ou físicos, bioquímicos ou funcionais. Os protocolos de criopreservação são feitos para minimizar tais efeitos negativos de estresse (ALMEIDA, 2006).

A célula espermática tem uma variedade de características funcionais altamente diferenciadas de acordo com cada região e que devem ser preservadas até a fertilização. A criopreservação ideal deve ter a função de preservar o maior número de células possível e a integridade de diferentes estruturas espermáticas (WATSON, 1995). No entanto, a exposição da célula à temperaturas abaixo da fisiológica, mesmo antes de ocorrer a congelação (no processo de estabilização da célula espermática, por exemplo), é responsável por mudanças na organização bidimensional dos lipídeos da membrana, diminuindo a longevidade dos espermatozoides pós-descongelação (HOLT, 2000). Este processo tem um grande

número de injúrias, primeiramente, a mudança de temperatura; segundo, a pressão osmótica presente pela exposição à diferença de osmolaridade dos crioprotetores e terceira, a formação e dissolução de gelo no meio extracelular. A severidade dos efeitos da refrigeração na criopreservação depende da velocidade de resfriamento, dos intervalos de temperatura e do ponto de temperatura (WATSON, 1981).

Mesmo com uma velocidade de resfriamento lenta, a mudança da temperatura induz alterações nas membranas. A explicação para tais efeitos deletérios à célula está relacionada, possivelmente, com a fase de transição dos lipídeos de membrana, resultando na separação de fase e perda da seletividade, característica das membranas biológicas de células vivas (WATSON; MORRIS, 1987). Mas segundo outros autores, esses danos causados às membranas ocorrem durante e após o resfriamento e são parcialmente revertidos após a descongelação (HOLT; NORTH, 1994).

A congelação convencional causa danos físico-químicos nesta estrutura, atribuídos à mudanças na fase lipídica e/ou aumento da peroxidação lipídica (ALVAREZ; STOREY, 1992). As proteínas integrais da membrana são agrupadas na fase de separação lipídica, e isto pode resultar em alterações funcionais (WATSON, 2000). A permeabilidade da membrana aumenta após o resfriamento (ROBERTSON et al., 1988), podendo ser devido a mudanças nos canais proteicos específicos. A regulação do cálcio é claramente afetada pelo processo de resfriamento e isto tem consequências sérias em termos de função celular (BAILEY; BURH, 1994); em muitos casos, a mudança é incompatível com a viabilidade celular. A entrada do cálcio durante o resfriamento do espermatozoide contribui tanto para mudanças importantes na capacitação espermática, quanto para eventos de fusões de membranas plasmática e acrossomal (WATSON, 2000), ou seja, a reação acrossomal.

Com a queda da temperatura, os lipídeos passam pela transição de estado fluido para gelatinoso, no qual as cadeias de ácidos graxos organizam-se em um modelo paralelo (HAMMERSTEDT et al., 1990), o que os impossibilita de se moverem aleatoriamente, resultando na formação de domínios cristalinos, com apenas pequenas regiões de lipídeos no estado líquido, onde ficam aderidas às proteínas (COTTORELLO; HENRY, 2002), produzindo uma estrutura rígida. Deste modo, áreas da membrana plasmática tornam-se fracas, sujeitas a rupturas, fusões

e permeáveis à íons, como o cálcio. Estes íons contribuem para mudanças no estado de capacitação e nos eventos fusionais entre a membrana plasmática e a membrana acrossomal externa, característicos da reação acrossomal (HAMMERSTEDT et al., 1991; WATSON, 2000). Componentes do citoesqueleto, inclusive, são sensíveis à mudança de temperatura. É possível que este fato possa contribuir para a fusão desorganizada e precoce dessas membranas após resfriamento e congelação (WATSON, 2000).

Durante o processo de congelação a água pura congela e cristais de gelo são formados a 0°C, enquanto que o ponto de congelação de uma solução é determinado pela concentração de partículas que ela contém, como soluto (AMANN; PICKETT, 1987). À medida que a água congela, os espermatozoides ficam aprisionados em canais de solvente, que permanecem na forma líquida. Este processo resulta no aumento da concentração dos solutos no meio que permanece descongelado. Com o início da congelação, progressivamente, é gerado um gradiente osmótico, que força a água a sair dos espermatozoides, desidratando-os e aumentando a concentração dos eletrólitos intracelulares. Estes eventos são denominados de efeito de solução (MAZUR, 1970). Uma alta concentração de solutos pode causar desidratação na célula espermática, levando a deformações celulares, danos na estrutura da membrana, desnaturação de proteínas, deslocamento de proteínas de membrana e desarranjos nas estruturas do citoesqueleto (GRAHAM, 1996). Quando os espermatozoides são congelados numa taxa de temperatura moderadamente rápida (-25 a -40°C/min), a água do compartimento intracelular não congelará e irá se difundir para fora da célula espermática devido a alta concentração de soluto no meio extracelular. Este processo causará desidratação celular. Se a taxa de resfriamento for lenta, os espermatozoides se tornam suficientemente desidratados e não ocorre a formação de grandes cristais de gelo no meio intracelular. Entretanto, este processo resulta em alta concentração de solutos no meio intracelular que causam danos à célula espermática. Abaixo de -20°C, os espermatozoides começam a apresentar mudanças biofísicas, principalmente na membrana plasmática e, abaixo de -60°C sofrem efeitos de descompensação iônica e de lipídeos suficientemente graves para causar choque térmico (GRAHAM, 1996).

De acordo com Zúccari (1998), o ponto de congelamento do citoplasma celular está normalmente abaixo de -1°C, mas as células geralmente permanecem não congeladas na faixa entre -10 a -15°C, isto é, se encontram super resfriadas, mesmo

quando o gelo está presente. Tal fato indica que a membrana plasmática pode prevenir a propagação do gelo extracelular para o interior da célula super resfriada. Considerando-se que a pressão de vapor de água super-resfriada é maior que a do gelo, as células começam a se equilibrar através da desidratação e ocorre uma concentração de eletrólitos no interior da célula. À medida que a solubilidade dos eletrólitos vai sendo ultrapassada, os solutos se precipitam alterando o pH e abaixo do ponto eutético do sistema, temperatura na qual não resta nenhum líquido, ocorrem a precipitação de todos os solutos. Existe dificuldade em se compreender o efeito de solução devido ao fato de pelo menos quatro fatores distintos estarem envolvidos durante o processo de congelação. São eles: 1) a água pura é removida em forma de gelo; 2) ocorre a concentração de solutos de alto e baixo peso molecular; 3) há a redução do volume celular; 4) os solutos se precipitam. Todos estes fatores têm sido estudados para explicar as lesões celulares, mas com exceção da precipitação de solutos, os demais dependem da temperatura e ocorrem simultaneamente durante o congelamento.

O problema da criopreservação não está na habilidade do espermatozoide em manter-se viável à temperatura de -196°C , mas sim nos danos que a célula sofre durante o resfriamento e o descongelamento, numa faixa de temperatura intermediária entre -15° e -60°C que os espermatozoides têm que passar duas vezes, uma no processo de congelamento e outra no descongelamento (AMAN; PICKET, 1987; PARKS; GRAHAM, 1992). O resfriamento rápido do sêmen da espécie equina entre 20 e 5°C predispõe o espermatozoide ao choque térmico. Nessa faixa crítica de temperatura o sêmen deve ser resfriado lentamente (MC KINNON, 1996). Se o processo de congelamento é realizado inapropriadamente, os espermatozoides sofrerão choque térmico. Este por sua vez induz danos irreversíveis as células espermáticas caracterizados por movimentos anormais, perda rápida da motilidade, danos acrossomais e de membrana plasmática, redução do metabolismo celular e perda de componentes celulares. O primeiro choque térmico pelo qual as células espermáticas passam durante o processo de congelação ocorre durante o resfriamento de 37° a 5°C (GRAHAM, 1996).

O resfriamento e a criopreservação desestabilizam as membranas espermáticas e conseqüentemente induzem reação acrossômica prematura, diminuindo a vida útil do espermatozoide no trato reprodutivo feminino e a fertilidade na inseminação artificial (WATSON, 1995).

Embora possa haver diferenças entre as espécies em relação à sensibilidade geral do espermatozoide frente à criopreservação, existe uma heterogeneidade nas células do ejaculado referente à resistência frente as mudanças de osmolaridade. O fato de indivíduos serem classificados como “bons” ou “maus congeladores” implica na existência de certas características genéticas e individuais quanto ao comportamento estrutural das membranas frente ao processo de criopreservação (HERNANDEZ et al., 2007).

2.5 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DA MEMBRANA ESPERMÁTICA

O espermatozoide, como qualquer outra célula em condições aeróbias, produz espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo a membrana mitocondrial o local de maior formação intracelular de EROs (GUTHRIE; WELCH, 2006) mas a maior parte delas são originadas do metabolismo normal da célula.

O espermatozoide suíno é muito suscetível à crioinjúria o que pode ser atribuído, em parte, à alta quantidade de ácidos graxos poliinsaturados presentes na membrana plasmática (WHITE, 1983) o que o torna mais propenso a peroxidação lipídica na presença de espécies reativas de oxigênio (EROs). Essas pequenas quantidades de EROs são fisiologicamente necessárias para que ocorram os processos de capacitação, hiperativação e reação acrossomal, permitindo que o espermatozoide penetre na zona pelúcida durante a fertilização (DE LAMIRANDE et al., 1998; O'FLAHERTY et al., 1999).

Dentre as EROs formadas, podemos citar o anion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os radicais hidroxil ($OH^{\cdot}$), hidroperoxil ($HO_2^{\cdot}$), peroxil ($RO_2^{\cdot}$) e alcóxil ($RO^{\cdot}$), e ainda o ácido hipocloroso ($HOCl$). No plasma seminal existem enzimas e algumas moléculas com ação antioxidante, tais como a glutathione peroxidase, superóxido desmutase, catalase, vitamina E, vitamina C, uratos, albumina, taurina, hipotaurina, entre outras (AITKEN et al., 1995; DE LAMIRANDE et al., 1997).

Esses agentes controlam a produção de pró-oxidantes, como as EROs, prevenindo possíveis danos celulares. Porém, na presença de um grande número de células inflamatórias e espermatozoides defeituosos, ou em procedimentos que diminuam acentuadamente a quantidade de plasma seminal, há um aumento na produção de EROs (BAUMBER et al., 2003; AITKEN et al., 2004). A produção excessiva de EROs, além da capacidade antioxidante do sêmen, determina o estresse oxidativo, que causa disfunções na própria célula espermática através de diferentes mecanismos, como a peroxidação dos lipídeos da membrana plasmática, inibição do metabolismo, da motilidade e da capacidade fecundante o que corresponde a um declínio na taxa de sobrevivência e fertilidade desse espermatozoide (AITKEN et al., 1995; CHATTERJEE; GAGNON, 2001).

Alguns autores demonstraram que a produção das EROs e a consequente peroxidação lipídica ocorrem no espermatozoide durante o processo de congelação e descongelação (ALVAREZ; STOREY, 1992). Desse modo, é possível que os cachacos considerados “bons congeladores” produzam espermatozoides menos suscetíveis a peroxidação lipídica e, portanto estes são mais resistentes às mudanças estruturais e funcionais que estas células sofrem durante os processos de congelação e descongelação (WATSON, 1995).

2.6 CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA

A capacitação é um evento sequencial que envolve numerosas mudanças fisiológicas. Ela foi descrita como a “janela da desestabilização” na qual o espermatozoide adquire a capacidade de fertilizar, mas está suscetível a degeneração da membrana e a reação acrossomal, que diminuem a probabilidade deste em fecundar o oócito (HARRISSON, 1996).

No ano de 1995, Watson sugeriu que as alterações induzidas nas membranas espermáticas pela criopreservação as tornam mais reativas após a descongelação, de tal modo que o espermatozoide criopreservado está em um estado parcialmente capacitado. Na verdade, vários grupos de pesquisa têm relatado que o espermatozoide refrigerado ou criopreservado apresentam comportamento

semelhante à capacitação como as alterações na fluidez das membranas, o aumento da concentração de íons intracelulares e o aumento das sinalizações intracelulares, essa série de eventos tornam o espermatozoide capaz de fertilizar, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (YANAGIMACHI, 1994). Além disso, estágios que antecedem a criopreservação da célula espermática envolvendo a refrigeração a 5°C têm demonstrado alterações semelhantes à capacitação em espermatozoides suínos (FLESCH; GADELLA, 2000).

A capacitação é uma via bioquímica à qual o espermatozoide deve ser submetido para ser capaz de fertilizar o oócito, considerando que a criopreservação induz danos biofísicos na célula espermática e que capacita esta a fertilização. Semelhanças entre a capacitação e a crioinjúria ainda não estão completamente elucidadas mas algumas alterações já foram identificadas, nas quais se incluem: remoção dos fatores periféricos das membranas, mudanças na composição lipídica, produção de espécies reativas de oxigênio, migração das proteínas de membrana, exteriorização de receptores, ativação dos canais iônicos, produção intracelular de cAMP e a fosforilação do aminoácido tirosina (WHITE; AITKEN, 1989; ZANEVELD et al., 1991; AITKEN et al., 1995; BURKES et al., 1995; VISCONTI et al., 1995; VISCONTI; KOPF, 1998).

A glicose é conhecida por ser essencial para que a capacitação ocorra com sucesso. Ela não apenas exerce a função como fonte de energia mas também permite que o espermatozoide tenha motilidade e fertilize o oócito (Goodson et al., 2012; Okabe et al., 1986). O colesterol, bicarbonato, cálcio intracelular e muitos outros fatores também estão envolvidos na capacitação (EVANS, 2012; YANAGIMACHI, 1994).

O bicarbonato e o cálcio têm a função de ativar a adenil ciclase e sinalizar a via (VADNAIS et al., 2011). O bicarbonato é um potente agente capacitador sendo quase ausente no plasma seminal (<1 mM), porém presente na tuba uterina em altas concentrações (>15 mM). O bicarbonato induz a ativação da via do AMPc (adenosina mono fosfato cíclico) que atua na ativação da proteína quinase A, a qual atua aumentando a fluidez da membrana plasmática (HARRISON et al., 1996). O bicarbonato induz as trocas entre os lipídios presentes nas monocamadas fosfolipídicas que compõem a bicamada lipídica dos espermatozoides equinos (GADELLA; HARRISON, 2000; RATHI et al., 2001; GADELLA et al., 2004). Estas trocas entre os fosfolipídios ocorrem somente na região apical da membrana

plasmática do espermatozoide, sendo que este fenômeno é pré-requisito para que ocorra o efluxo do colesterol (FLESCH et al., 2001).

No espermatozoide de camundongos é evidente a necessidade da presença de Ca^{2+} no meio extracelular para que haja a capacitação, sendo que este atua na via da adenilato ciclase (VISCANTI et al., 1995), embora estes estudos não tenham mensurado o Ca^{2+} intracelular. Uma distinção deve ser feita entre a capacitação e a subsequente reação acrossomal, já que nas células viáveis *in vivo*, a conclusão da anterior precede o início da última (HUNTER, 2001). Essas alterações ocorrem no nível de membrana e conduzem a modificações, hiperativação e reação acrossomal, em um número variável de espermatozoides dentro de uma população (DE LAMIRANDE et al., 1997).

Apesar dos espermatozoides criopreservados serem capazes de fertilizar, a sua longevidade no trato reprodutivo da fêmea é consideravelmente menor do que a do espermatozoide *in natura*, ainda não capacitado (BAILEY et al., 2000).

O espermatozoide, uma vez capacitado demonstra um padrão de movimento vigoroso chamado de hiperativação, que nada mais é do que uma forte movimentação que o permite penetrar na zona pelúcida. A hiperativação é caracterizada pelo batimento flagelar assimétrico constante acompanhado do aumento de fluxo intra citoplasmático de Ca^{2+} (CHANG; SUAREZ, 2011).

Após a capacitação, o último passo para que o espermatozoide esteja pronto para a fertilização é a reação acrossomal. O acrossoma é uma organela subcelular que está situada na extremidade livre da cabeça do espermatozoide e está preenchido de enzimas e proteína de ligação na zona pelúcida (HARISSON, 1996).

2.7 HIPERATIVAÇÃO

O processo de capacitação espermática também envolve mudanças no padrão de motilidade, o qual é denominado de hiperativação. A capacitação espermática é um evento preparatório e gradual para a fertilização, com várias fases, através do qual os espermatozoides passam durante seu percurso ao longo do trato reprodutivo feminino (YANAGIMACHI, 1994). O movimento de hiperativação dos espermatozoides foi primeiramente relatado em 1969 por Yanagimachi, que

observou *in vitro* que, conforme os espermatozoides alcançam a capacidade de fertilizar oócitos, os flagelos começam a bater com mais vigor do que antes, permitindo a liberação do espermatozoide do epitélio do istmo (DEMOTT; SUAREZ, 1993) e a penetração da zona pelúcida.

A hiperativação é caracterizada por movimentos vigorosos do flagelo, marcante deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide e presença de uma trajetória não progressiva (SUAREZ et al., 1983). A hiperativação deve ter seu início em lugar e momento apropriado para que o espermatozoide consiga realizar a fertilização. Embora o líquido folicular seja encontrado na ampola da tuba uterina no momento da ovulação das porcas, somente < 1% permanece retido no lúmen da ampola (HANSEN et al., 1991)

Alguns fatores biológicos, tais como, Ca^{2+} , AMPc, bicarbonato e substratos metabólicos são essenciais para o início e manutenção da hiperativação *in vitro*. Sabe-se que o Ca^{2+} desempenha um papel importante na hiperativação. Em espermatozoides de hamster, o cálcio extracelular é necessário para manter a hiperativação (YANAGIMACHI, 1994). O AMPc é necessário mas sozinho não é o suficiente para que a hiperativação ocorra, é preciso o aumento transitório de AMPc e Ca^{2+} . Ressalta-se que o Ca^{2+} é o responsável pela hiperativação (COOK; BABCOCK, 1993).

Somando-se a estes achados, Colenbrander et al. (2001) descreveram que a porcentagem de células hiperativadas de uma determinada população de células com motilidade não teve mudanças quando induzidas a capacitação, concluindo que este movimento característico não pode ser usado na avaliação da capacitação. As alterações fisiológicas que tornam o espermatozoide capaz de sofrer a reação acrossomal são coletivamente chamadas de capacitação (YANAGIMACHI, 1994). Embora a hiperativação, *in vitro*, ocorra geralmente em algum ponto durante a capacitação, as vias que conduzem à hiperativação e capacitação não são totalmente vinculadas. Sabe-se que *in vitro* o bicarbonato é essencial tanto para a capacitação quanto para a hiperativação. Mas a hiperativação requer maiores concentrações de bicarbonato do que a capacitação (YANAGIMACHI, 1994).

O movimento característico apresentado pela célula espermática durante o fenômeno da hiperativação pode ser detectado pelas análises computadorizadas da motilidade (CASA – Computer Assisted Sperm Analysis). Este padrão de movimento é representado pelo aumento do ALH (amplitude do deslocamento lateral da cabeça)

e do VCL (velocidade curvilínea) (WHITE; AITKEN, 1989; BURKMAN, 1991). Para a espécie suína Schmidt e Kamp (2004) propõem que o espermatozoide deve apresentar um ALH $>3,5\mu\text{m}$ e VCL $>97\mu\text{m/s}$.

2.8 CONCENTRAÇÃO E VOLUME DE ARMAZENAMENTO DO SÊMEN CRIOPRESERVADO

Em suínos, a redução na taxa de parição e tamanho da leitegada foi relacionada em fêmeas inseminadas com sêmen congelado quando comparadas com as inseminadas com sêmen fresco (JOHNSON, 1998). Uma outra desvantagem do sêmen congelado para a inseminação é o grande volume necessário para uma dose inseminante. O método de armazenamento mais utilizado tem sido a palheta de 5 mL pois impossibilita o rápido congelamento e descongelamento (ALMLID; HOFMO, 1996).

O sêmen de suínos pode ser acondicionado em palhetas plásticas de diferentes volumes, 0,25 e 0,5 e 1,0 mL (BERGER; FISCHERLEITNER, 1992; JOHNSON et al., 2000), palhetas planas de 5 mL (WEITZE et al., 1987), palhetas de metal (FRASER; STRZEZEK, 2007) ou em uma embalagem plástica e plana, o FlatPack. Esta última comprovou ser melhor ou tão boa quanto a palheta de 0,25 mL em termos de criopreservação apesar da sua capacidade de armazenamento ser de 5 mL (com concentração de 5×10^6 espermatozoides, para a realização da inseminação intracervical) o que torna desnecessário a descongelação de várias palhetas para produzir uma dose inseminante (ERIKSSON et al., 2002).

Quando comparadas com palhetas de menor volume, as FlatPacks, são consideradas criobiologicamente mais adequadas, pois possuem uma grande superfície para dissipar o calor durante o resfriamento e descongelação. Consequentemente, esta demonstrou uma maior taxa de fertilidade, taxa de parição e tamanho da leitegada (ERIKSSON et al., 2002). No entanto, doses com alta concentração espermática conspiram contra o melhor aproveitamento do ejaculado

e com a utilização da inseminação intra uterina. A utilização de recipientes de menor volume e maior concentração espermática para a produção de uma dose inseminante se faz possível. Recentemente, o sêmen suíno foi congelado em novas embalagens, com menor volume (0,5 – 0,7mL) e maiores concentrações ($1 - 2 \times 10^9$), o MiniFlatPack (BWANGA et al., 1991). Curiosamente, não apenas o congelamento foi mais homogêneo do que nas palhetas 5 mL (EKWALL et al., 2007) mas a criotolerância (SARAVIA et al., 2005) e a fertilidade desses espermatozoides criopreservados em MiniFlatPack por meio da inseminação intrauterina (WONGTAWAN et al., 2006) foram iguais ou algumas vezes melhores do que quando utilizadas as palhetas de 0,5mL.

Durante a congelação, e ainda mais durante o descongelamento na fase em que ocorrem as mudanças de fase da água, ocorrem diferenças consideráveis na distribuição da temperatura no centro e na periferia da palheta (ERIKSSON; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000).

3 HIPÓTESES

O aumento da concentração espermática na palheta de 0,5mL para a criopreservação do sêmen suíno levará a:

- Prejuízos nas características de motilidade espermática;
- Danos nas membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial;
- Maiores valores de peroxidação lipídica, instabilidade da membrana espermática e defeitos na morfologia espermática.

OBJETIVOS

4 OBJETIVOS

Avaliar as características espermáticas pós-criopreservação do espermatozóide suíno congelado nas concentrações de 100, 200, 300, 600 e 800×10^6 espermatozoides/mL, em palhetas de 0,5mL sobre:

- As características do movimento espermático;
- A integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial;
- A peroxidação lipídica, instabilidade da membrana espermática e defeitos na morfologia espermática.

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este estudo foi delineado em blocos generalizados, onde cada cachão foi considerado um bloco. Sendo que 1/5 do ejaculado foi considerado a unidade experimental.

Figura 1 – Esquema experimental das análises das amostras

Fonte: (RAVAGNANI, G. M., 2015)

6 MATERIAL E MÉTODO

6.1 LOCAL E PERÍODO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado nos Laboratórios de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos (LATES) (Figura 2) e de Pesquisa em Suínos (LPS), ambos pertencentes ao Núcleo de Pesquisa em Suínos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) (Figura 3) pertencente à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, ambos localizados no *Campus* Administrativo de Pirassununga. O período experimental estendeu-se de Janeiro de 2014 a Janeiro de 2015.

Figura 2 - Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos (LATES, FMVZ-USP)

Fonte (RAVAGNANI, G. M., 2015)

Figura 3 – Citômetro de Fluxo BDFACSAria® (LMMD, FZEA-USP).

Fonte: (RAVAGNANI, G. M., 2015)

6.2 ANIMAIS

Foram utilizados cinco cachorros híbridos comerciais, Agrocetes® da linhagem AGPIC 415, produzidos em Patos de Minas, MG - Brasil, os quais foram submetidos a manejo nutricional e sanitário idênticos. Os animais ficaram alojados nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Suínos pertencente ao Núcleo de Pesquisa em Suínos da FMVZ/USP. Os animais foram alojados em baias individuais com metragem de 9,76 m²/animal, providas de comedouros e bebedouros tipo chupeta (Figura 04). Durante o período experimental foi fornecida dieta basal seguindo recomendações do NRC (1998). O consumo estabelecido foi de acordo com o peso do animal podendo variar de 1,8 a 2,0 kg/animal/dia (3,15 Mcal/EM/Kg; 16% PB; 0,85% lisina; 0,75% Ca; 0,65% P). O arração foi dividido em duas vezes ao dia, 7:00 e 15:00 horas.

Figura 4 – Alojamento dos cachaços no Núcleo de Pesquisa em Suínos (FMVZ-USP)

Fonte: (RAVAGNANI, G. M., 2015)

6.3 COLETA E ANÁLISE DE SÊMEN PRÉ-CRIOPRESERVAÇÃO

As coletas de sêmen foram realizadas pelo método da mão-enluvada, sendo coletada apenas a fração rica (FR) do ejaculado. Anteriormente a cada coleta, o animal foi submetido à lavagem do divertículo prepucial (Figura 5), com anterior esgotamento do mesmo. A fração oriunda da glândula bulbo-uretral (fração gelatinosa) foi devidamente separada com auxílio de papel filtro fixado sobre a parte superior do copo de coleta o qual foi previamente aquecido e mantido durante toda a coleta em recipiente isotérmico a 38°C.

O sêmen *in natura* foi avaliado quanto ao volume (por meio do uso de um bequer graduado), concentração (com o auxílio de um hematocitômetro), e características da motilidade, através do software *Sperm Class Analyser* (SCA® – Microptics Barcelona, Espanha), acoplado a um microscópio equipado com contraste de fase (Nikon, Modelo Eclipse Ni-U 80i) e a morfologia espermática foi avaliada por contraste de interferência diferencial (DIC). Somente ejaculados com

motilidade total acima de 75% e alterações morfológicas abaixo de 20% foram submetidos à criopreservação.

Figura 5 – (A) Higienização do divertículo prepucial e (B) coleta de sêmen através do método da mão enluvada

Fonte (RAVAGNANI, G. M., 2015)

6.3.1 Volume

A leitura do volume foi determinada com o auxílio de um béquer de 100°mL (Figura 6), pré-aquecido a 37°C.

Figura 6 – Determinação do volume ejaculado em béquer de 100mL

Fonte: (RAVAGNANI, G. M., 2015)

6.3.2 Concentração espermática

A concentração espermática foi realizada por meio da diluição do sêmen em formol salino 5% (Anexo C) na proporção 1:400, sendo colocado 5 μ L de sêmen em 1995 μ L de formol salino tamponado (Anexo C) e a contagem de espermatozoides foi feita em câmara de Neubauer, aumento de 400 $^{\circ}$ x (Figura 7).

Figura 7 - Contagem espermática por meio da utilização da câmara de Neubauer, aumento de 400x

Fonte (RAVAGNANI, G. M., 2015)

6.3.3 Avaliação computadorizada das características do movimento espermático

A motilidade espermática foi avaliada por meio do *software* Sperm Class Analyser (SCA –Microoptics Barcelona, Espanha), acoplado a um microscópio equipado com contraste de fase (Nikon, Modelo Eclipse Ni-U 80i) com sêmen diluído em meio TALP *sperm* (Anexo A) (25×10^6 espermatozoides/mL), com ajuste prévio do setup para sêmen suíno (Figuras 8 e 9). As análises foram feitas no Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos (LATES-FMVZ/USP). Foram analisadas as características: motilidade total (%), motilidade progressiva (%), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %). Conjuntamente a estas análises foi realizado o ajuste da ferramenta Edit/Sort, usado para avaliar a porcentagem de células hiperativadas na amostra. Considerou-se os valores de $\text{ALH} > 3,5 \mu\text{m}$ e $\text{VCL} > 97 \mu\text{m/s}$ (SCHIMIDT; KAMP, 2004), para assim avaliar a porcentagem de espermatozoides hiperativos (HIPER).

Figura 8 - Sistema de análise computadorizada do sêmen (SCA[®], Microptic S.L., Barcelona, Espanha) instalado em um computador acoplado a uma captura a imagem de um microscópio de epifluorescência (Nikon[®], Modelo Eclipse NI-U)

Fonte (RAVAGNANI, G. M., 2015)

Figura 9 – Imagem gerada pelo programa de análise computadorizada do sêmen pelo programa *Sperm Class Analyzer* (SCA[®], Microptics S. L., Barcelona, Espanha)

Fonte (RAVAGNANI, G. M., 2015)

Legenda: O trajeto vermelho representa os espermatozoides com motilidade progressiva rápida, em verde os espermatozoides com motilidade progressiva lenta, em azul os espermatozoides sem motilidade progressiva e em amarelo os espermatozoides imóveis.

6.3..4 Avaliação das características morfológicas pré-criopreservação

As avaliações das características morfológicas dos espermatozoides foram realizadas pela técnica da câmara úmida. Para isso, o sêmen foi diluído e fixado em formol salino tamponado (Anexo C), previamente aquecido, a 37°C. Uma gota do sêmen diluído entre lâmina e lamínula, foi preparada e a avaliação foi realizada pela contagem de 200 células em aumento de 1000 x sob microscopia de contraste diferencial de interferência diferencial de fase (Nikon®, modelo 80i) (Figura 10).

Os defeitos foram divididos em defeitos de acrossoma, cabeça, peça intermediária, colo e cauda.

Figura 10 – Avaliação das características morfológicas através da microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) (Nikon®, modelo 80i)

Fonte (RAVAGNANI, G. M., 2015)

6.4 Preparo e criopreservação do sêmen

Após as análises iniciais, o sêmen foi diluído com o diluidor BotuSui® (Botupharma®, Botucatu, SP, Brasil) que é um diluidor para a criopreservação do sêmen suíno, em 5 concentrações diferentes, a saber: 100, 200, 300, 600 e 800×10^6 espermatozoides/mL.

Após a homogeneização, as concentrações finais foram envasadas em palhetas francesas de 0,5 mL (IMV® Internacional, St. Paul, Minesota, USA) sendo que 10 palhetas de cada tratamento foram envasadas, cuidadosamente lacradas com álcool polivinílico em pó. Para facilitar a identificação e avaliação de cada tratamento, foram padronizadas as cores do álcool polivinílico e canetas marcadoras, sendo azul, roxo, verde, vermelho e preto para as concentrações com 100, 200, 300, 600 e 800×10^6 espermatozoides/mL, respectivamente. As palhetas foram previamente identificadas (Figura 11) e então submetidas à congelação.

A criopreservação do sêmen foi realizada utilizando um sistema automático (TK 3000® compacta, TK Tecnologia em Congelação Ltda, Uberaba, Minas Gerais, Brasil), composto por um aparelho equipado com porta-palhetas, compartimento de refrigeração e caixa térmica para nitrogênio líquido. Para a refrigeração, as palhetas foram colocadas no porta-palhetas, o qual foi acondicionado ao compartimento de refrigeração, permanecendo neste até alcançar 5°C, obedecendo uma curva de refrigeração de -0,5°C/minuto, com duração aproximada de 50 minutos. Decorrido este período o porta-palhetas foi removido para a caixa térmica contendo nitrogênio líquido na qual a curva de congelação foi procedida com uma taxa de -20°C/minuto de 5°C até -120°C. Após a curva de congelação as palhetas foram removidas do porta-palhetas e imersas em nitrogênio líquido (-196°C) (Figura 12). Por fim, as palhetas foram raqueadas e armazenadas em botijões criogênicos (Figura 13).

Figura 11 – Distribuição dos grupos experimentais e envase das palhetas de 0,5^omL (IMV[®] Internacional, St. Paul, Minnesota, USA)

Fonte (RAVAGNANI, G. M., 2015)

Figura 12 – Máquina de criopreservação automática do sêmen (TK 3000[®] compacta, TK Tecnologia em Congelação Ltda., Uberaba, Minas Gerais, Brasil)

Fonte (RAVAGNANI, G. M., 2015)

Figura 13 – Armazenamento das amostras de sêmen em botijão criogênico (MVE®, Minnesota, EUA)

Fonte (RAVAGNANI, G. M., 2015)

6.5 Análise do sêmen pós-criopreservação

Para a análise do sêmen pós-criopreservação, duas palhetas de sêmen de cada tratamento foram descongeladas a 37°C por 30 segundos (Figura 14), homogeneizadas em microtubos de 200µL e mantidas em banho-Maria seco a 37°C. Foram analisadas as características de motilidade pela análise computadorizada utilizando o *software Sperm Class Analyser* (SCA® –Microptic S. L. Barcelona, Espanha) e a morfologia espermática por microscopia de contraste de interferência diferencial, como descrito para o sêmen *in natura*. Além destas avaliações, foram realizadas análises das membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial; peroxidação lipídica e fluidez das membranas espermáticas utilizando a citometria de fluxo.

Figura 14 – Descongelamento das amostras de sêmen em banho-Maria a 37°C por 30 segundos

Fonte (RAVAGNANI, G. M., 2015)

6.5.1 Avaliação computadorizada das características do movimento espermático

Idem item 6.3.3

6.5.2 Avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e do potencial mitocondrial por citometria de fluxo

As alíquotas retiradas das amostras foram adicionadas ao TALP *sperm* (Anexo A) em tubos de microcentrifugação (1,5 mL) pré-aquecidos a 37°C, a fim de se obter amostras com concentração de 5×10^6 espermatozoides por mL. A seguir, foi adicionado 0,5 µL da sonda Hoechst 33342 (H33342; 2,5 µg/mL, H-1399, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) com posterior incubação por 10 minutos a 37°C. O uso desta sonda teve como objetivo, corar o DNA das células espermáticas para que não haja a contagem de forma equivocada de partículas com o mesmo tamanho e granulosidade do espermatozoide (DE ANDRADE et al., 2011). Passado o período de incubação, foram adicionados à amostra 1 µL de Iodeto de Propídio (IP-0,5 mg/mL, Sigma-AldrichCo., Saint Louis, Missouri, EUA) que é uma sonda

fluorescente que possui afinidade ao DNA e cora em vermelho o núcleo de células com membrana plasmática lesada (ARRUDA, 2000), JC-1 (153 $\mu\text{M}/\text{mL}$, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) que detecta células com potencial mitocondrial alto ou baixo corando em vermelho ou verde, respectivamente, conjuntamente com a adição de 20 μL de aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma-AldrichCo., Saint Louis, Missouri, EUA).

A associação destas sondas foi realizada com os seguintes objetivos; corar as células com membrana plasmática lesada (IP positivo), com a membrana acrossomal lesada (FITC-PSA positivo) e com alto potencial mitocondrial, quando coradas em vermelho ou verde, respectivamente. (CELEGHINI et al., 2010) (Figura 14). Após 10 minutos de incubação a 37°C, os espermatozoides foram diluídos com a adição de 150 μL de TALP *sperm* e transferidos para tubos graduados até 15 mL (37°C). Com isso, as amostras apresentaram uma concentração de $2,5 \times 10^6$ espermatozoides por mL no momento de serem analisadas pela técnica de citometria de fluxo (Figura 15).

Figura 15 – Gráficos gerados a partir do software FACSDiva 6.1, das análises de integridade de membranas plasmática e acrossomal e potencial mitocondrial na citometria de fluxo

Fonte (RAVAGNANI, G. M., 2015)

Legenda: A) Pré-seleção espermática pelo do tamanho e complexidade interna das células. B) Seleção da população Hoescht 33342 (H33342) positiva a partir da população pré-selecionada no gráfico A. C) Histograma com a separação das células positivas (mortas) e negativas (vivas) para iodoeto de propídeo. D) Histograma com a separação de células com potencial mitocondrial alto ou baixo. E) Histograma com a separação de células com acrossoma reagido (FITC-PSA positivas) e com acrossoma não reagido (FITC-PSA negativas). F) Tabela estatística gerada pelo software com o percentual de cada população analisada.

6.5.3 Avaliação da peroxidação lipídica por citometria de fluxo

As amostras para coloração e análise em citometria de fluxo foram diluídas no meio TALP *sperm* (TALP; Anexo A) (BAVISTER et al., 1983) ou em meio modificado de Tyrode's (TALPm) (ANEXO B), o pH do meio foi corrigido para 7,4 com o uso de NaOH 5 N., quando necessário.

Foram retiradas alíquotas de sêmen durante as etapas de análise a fim de obter amostras diluídas em TALPm com 5×10^6 espermatozoides/mL. A estas amostras foram adicionados 2 μ L de Hoechst 33342 (H33342; 2,5 μ g/mL, H-1399, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) com posterior incubação por 10 minutos a 37°C. Estas foram então coradas com 0,5 μ L da sonda C11-BODYPY^{581/591} (1mg/mL, D-3861, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) incubadas por 30 minutos a 37°C (RAPHAEL et al., 2008). Passado o período de incubação, foram transferidas para outros microtubos 145 μ L destas soluções, agora, coradas com a sonda C11-BODYPY^{581/591}. Então adicionadas as amostras 3 μ L de Iodeto de Propídio (IP-0,5 mg/mL, L0770, Sigma-AldrichCo., Saint Louis, Missouri, EUA). Após 5 minutos de incubação a 37°C, os espermatozoides foram diluídos com a adição de 150 μ L de TALPm e transferidos para tubos graduados de 15mL (37°C). Com isso, as amostras apresentaram uma concentração de $2,5 \times 10^6$ espermatozoides por mL no momento de serem analisadas por citometria de fluxo.

Após a adição das sondas fluorescentes indicadas, as amostras de sêmen incubadas foram analisadas no citometro de fluxo BD FACSAria[®] controlado pelo software BDFACS Diva 6.0 (Beckton-Dickeson, San Jose, USA) (Figura 16). As amostras passaram no instrumento com uma taxa de aquisição de aproximadamente 600-1000 eventos/s, sendo adquiridas de 5000 a 10000 células por análise. As células foram excitadas simultaneamente por um laser de argônio na faixa de 488 nm e por um laser Near UV na faixa de 375 nm.

Figura 16 – Gráficos gerados a partir do software FACSDiva 6.1, da sonda de peroxidação lipídica e capacitação espermática na citometria de fluxo

Fonte: (RAVAGNANI, G. M., 2015)

Legenda: A) Pré-seleção espermática pelo tamanho e complexidade interna das células. B) Seleção da população Hoescht 33342 (H33342) positiva a partir da população pré-selecionada no gráfico A. C) *Dotplot* com a separação das células positivas (mortas) e negativas (vivas) para Iodeto de Propídio. D) Histograma de FITC-A (fotomultiplicador longpass 502 e bandpass 530/15) gerado a partir das células vivas. E) Mediana da intensidade de fluorescência das células positivas e negativas para sonda C11-Bodipy^{581/591}.

6.5.4 Avaliação da estabilidade (fluidez) da membrana plasmática por citometria de fluxo

Para a análise da estabilidade da membrana plasmática pela técnica de citometria de fluxo (FLESCHE et al., 1999), as amostras foram incubadas em solução de TALPM na concentração de 5×10^6 espermatozoides/mL em um volume final de

147 μL . Foram então adicionados 2 μL de Hoechst 33342 (H33342; 2,5 $\mu\text{g/mL}$, H-1399, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) com posterior incubação por 10 minutos a 37°C. Em seguida 0,5 μL da sonda fluorescente Yo-Pro-1 (7,5 μM -Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) foi adicionada à amostra obtendo-se uma concentração final de 25 nM. A membrana plasmática íntegra é impermeável ao Yo-Pro-1, o qual se liga ao DNA das células com a membrana plasmática lesada.

Então, a amostra foi incubada por 20 minutos e posteriormente foi adicionada 0,5 μL da sonda fluorescente Merocianina 540 (810 μM -MolecularProbes Inc., Eugene, Oregon, EUA) a fim de se obter uma concentração de 2,7 μM em uma solução final de 150 μL , em seguida estas foram incubadas por 70 segundos. Foram então diluídas em 150 μL de TALPm e analisadas por citometria de fluxo (Figura 17), no qual foram avaliadas as porcentagens de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (Yo-Pro-1 negativo) com aumento na desordem da bicamada lipídica (Merocianina 540 positivo).

Figura 17 - Gráficos gerados a partir do software FACSDiva 6.1, da sonda Merocianina na citometria de fluxo

Fonte (RAVAGNANI, G. M., 2015)

Legenda: A) Pré seleção espermática pelo tamanho e complexidade interna das células. B) Seleção da população Hoescht 33342 (H33342) positiva a partir da população pré-selecionada no gráfico A. C) Dotplot com a separação das células positivas (mortas) e negativas (vivas) para Yo-Pro 1. D) Histograma de FITC gerado a partir de células vivas. E) Medida da intensidade de fluorescência das células positivas para Merocianina-540.

6.6 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (PROC MIXED), empregando-se o programa SAS (2002). O delineamento experimental foi em blocos, sendo cada cachaço considerado um bloco e considerou-se o tratamento como o fator principal (Tabela 01). Os tratamentos foram avaliados pelo teste de médias PDDIF do PROC MIXED do programa SAS (2002). Foi considerado o nível de 5 % de significância. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. (Anexo F)

7 RESULTADOS

Nesta seção encontram-se descritos os resultados do presente estudo.

7.1 Efeito da criopreservação sobre as células espermáticas

Neste tópico serão apresentados os resultados da criopreservação, em palhetas de 0,5mL, sobre as alterações no movimento espermático; na integridade das membranas acrossomal e plasmática e potencial mitocondrial; na peroxidação lipídica, na manutenção da estabilidade da membrana plasmática e nas características morfológicas do espermatozoide suíno.

7.1.1 Efeito da criopreservação nas características do movimento espermático

Os resultados das características de motilidade do sêmen suíno criopreservado estão descritos na tabela 2. Diante disso nota-se que o tratamento influenciou nas

seguintes características: motilidade total (MT,%), motilidade progressiva (MP,%), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), linearidade (LIN,%), retilinearidade (STR, %), frequência de batimento flagelar (BCF, Hz) e hiperativação (HIPER,%), sendo verificada diferença ($p < 0,05$). É possível verificar que o aumento da concentração espermática prejudica estas características.

Em relação a velocidades curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$) e amplitude lateral da cabeça (ALH, μm) observou-se apenas uma tendência ao efeito de tratamento ($p > 0,05$).

Tabela 1 – Média ± erro padrão das características da cinética espermática avaliadas pelo programa *Sperm Class Analyser* (SCA) de espermatozoides submetidos à criopreservação em cinco diferentes concentrações em palhetas de 0,5mL. As características analisadas foram motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade de curvilinear (VCL, µm/s), velocidade progressiva (VSL, µm/s), velocidade de trajeto (VAP, µm/s), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %), amplitude lateral da cabeça (ALH, µm), frequência de batimento flagelar (BCF, Hz) e hiperativação (%)

Característica da cinética espermática	100x10 ⁶ sptz/mL	200x10 ⁶ sptz/mL	300x10 ⁶ sptz/mL	600x10 ⁶ sptz/mL	800x10 ⁶ sptz/mL
Motilidade Total (%)	20,31 ± 2,16 ^a	19,87 ± 1,94 ^{a b}	20,70 ± 1,84 ^a	14,60 ± 1,55 ^c	9,90 ± 1,16 ^d
Motilidade Progressiva (%)	13,45 ± 1,80 ^a	12,69 ± 1,73 ^a	12,40 ± 1,44 ^a	7,86 ± 1,02 ^b	4,42 ± 0,72 ^c
VCL (µm/s)	56,82 ± 3,09	60,50 ± 3,71	59,90 ± 2,62	55,52 ± 3,21	44,39 ± 3,25
VSL (µm/s)	31,28 ± 2,31 ^a	33,80 ± 2,75 ^a	31,13 ± 1,95 ^a	26,23 ± 2,61 ^a	20,76 ± 2,42 ^b
VAP (µm/s)	39,02 ± 2,63 ^a	41,57 ± 3,09 ^a	40,10 ± 2,21 ^a	34,11 ± 3,13 ^a	25,47 ± 2,73 ^b
LIN (%)	54,00 ± 1,76 ^a	54,35 ± 2,21 ^a	49,36 ± 2,10 ^{a b}	49,10 ± 2,29 ^{a b}	44,92 ± 2,92 ^b
STR (%)	81,26 ± 1,09 ^a	77,89 ± 1,86 ^a	77,61 ± 1,39 ^{a b}	74,72 ± 1,92 ^{a b}	72,64 ± 2,40 ^b
ALH (µm)	2,60 ± 0,09	2,57 ± 0,11	2,81 ± 0,07	2,70 ± 0,10	2,50 ± 0,13
BCF (HZ)	9,35 ± 0,24 ^a	8,80 ± 0,42 ^a	8,85 ± 0,42 ^a	7,78 ± 0,54 ^{a b}	6,46 ± 0,68 ^b
HIPER (%)	3,59 ± 0,54 ^a	3,24 ± 0,42 ^a	3,14 ± 0,33 ^a	2,15 ± 0,32 ^{a b}	1,28 ± 0,22 ^b

Fonte: (RAVAGNANI, G. M., 2015)

Legenda: ^{a, b, c, d} Letras minúsculas diferentes na mesma linha, diferem estatisticamente p<0,05 (teste PDDIF)

7.1.2 Efeito da criopreservação nas membranas plasmáticas e acrossomal e potencial mitocondrial

Através da associação de sondas fluorescentes e da citometria de fluxo descritas no item 6.5.2 é possível avaliar 8 categorias de células (MIAIAP, MIARAP, MIAIBP, MIARBP, MLAIAP, MLARAP, MLAIBP e MLARBP), dentre as quais a MIAIAP é a mais importante pois o espermatozoide possui as membranas acrossomal e plasmática intactas e alto potencial mitocondrial, mas não houve diferença estatística ($p > 0,05$) nas cinco concentrações estudadas, como é possível observar na tabela 3.

As demais categorias celulares (MIAIAP, MIAIBP, MIARBP, MLAIAP, MLARAP, MLAIBP e MLARBP) não foram influenciadas estatisticamente pelas diferentes concentrações estudadas ($p > 0,05$).

Tabela 2 - Média $\pm$ erro padrão das células MIAIAP (Membrana Íntegra Acrossomo Íntegro Alto Potencial Mitocondrial), MIARAP: (Membrana Íntegra Acrossomo Reagido Alto Potencial Mitocondrial), MI (Membrana Plasmática Íntegra), AI (Acrossomo Íntegro), AP (Alto Potencial Mitocondrial), expressos em porcentagem (%), de espermatozoides suínos submetidos à criopreservação em cinco diferentes concentrações em palhetas de 0,5mL, avaliadas pela citometria de fluxo

Categoria Celular	100x10 ⁶		200x10 ⁶		300x10 ⁶		600x10 ⁶		800x10 ⁶	
	sptz/mL		sptz/mL		sptz/mL		sptz/mL		sptz/mL	
MIAIAP	6,00 $\pm$ 0,93		7,18 $\pm$ 1,06		8,18 $\pm$ 1,21		7,13 $\pm$ 1,16		5,58 $\pm$ 0,85	
MI	23,63 $\pm$ 4,27		19,58 $\pm$ 2,32		22,38 $\pm$ 3,21		25,16 $\pm$ 4,26		11,13 $\pm$ 1,37	
AI	21,04 $\pm$ 3,95		14,56 $\pm$ 2,29		23,28 $\pm$ 5,09		15,20 $\pm$ 2,13		11,04 $\pm$ 1,61	
AP	10,76 $\pm$ 2,41		9,82 $\pm$ 1,27		14,36 $\pm$ 2,59		9,24 $\pm$ 1,29		9,00 $\pm$ 1,65	

Fonte: (RAVAGNANI, G. M., 2015)

Legenda: ^{a, b} Letras minúsculas diferentes na mesma linha, diferem estatisticamente $p < 0,05$ (teste PDDIF)

7.1.3 Efeito da criopreservação na peroxidação lipídica

Apesar desta variável analisada não ter apresentado diferença estatística ($p < 0,05$) quando realizada a criopreservação com 600×10^6 sptz/mL, foi obtido um maior valor médio ($355,78 \pm 6,59$) quando analisada através da citometria de fluxo, seguida de 300×10^6 , 800×10^6 , 100×10^6 e 200×10^6 sptz/mL ($342,90 \pm 5,98$, $335,91 \pm 7,28$, $334,23 \pm 6,55$, $333,50 \pm 5,07$, respectivamente) (Tabela 4).

Tabela 3 – Média $\pm$ erro padrão da peroxidação lipídica, medida em intensidade de fluorescência (a.u.), de espermatozoides suínos submetidos à criopreservação em cinco diferentes concentrações em palhetas de 0,5 mL, avaliados pela citometria de fluxo

Concentração Espermática/mL	Peroxidação Lipídica (a. u.)
100×10^6	$334,23 \pm 6,55$
200×10^6	$333,50 \pm 5,07$
300×10^6	$342,90 \pm 5,98$
600×10^6	$355,78 \pm 6,59$
800×10^6	$335,91 \pm 7,28$

Fonte: (RAVAGNANI, G. M., 2015)

7.1.4 Efeito da criopreservação na manutenção da estabilidade (fluidez) da membrana plasmática

Diante dos resultados (Tabela 5) é possível constatar que a concentração de 600×10^6 sptz/mL ($1382,64 \pm 27,77$) foi a concentração de maior valor médio de células capacitadas, seguida das concentrações 300, 100, 800 e 200×10^6 sptz/mL ($1369,08 \pm 26,80$, $1352,75 \pm 31,97$, $1350,61 \pm 25,36$, $1343,83 \pm 21,72$).

respectivamente), porém estes dados não apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 4 – Média $\pm$ erro padrão da desordem lipídica, expressa em intensidade de fluorescência média (a. u.), de espermatozoides suínos submetidos à criopreservação em cinco diferentes concentrações em palhetas de 0,5mL, avaliados por citometria de fluxo

Concentração Espermática/mL	Capacitação Espermática (a. u.)
100x10⁶	1352,75 $\pm$ 31,97
200x10⁶	1343,83 $\pm$ 21,72
300x10⁶	1369,08 $\pm$ 26,80
600x10⁶	1382,64 $\pm$ 27,77
800x10⁶	1350,61 $\pm$ 25,36

Fonte: (RAVAGNANI, G. M., 2015)

7.1.5 Efeito da criopreservação nas características morfológicas do espermatozoide suíno

De acordo com os resultados das características morfológicas não houveram diferenças ($p < 0,05$) entre as cinco concentrações estudadas (Tabela 6). Fato este que não vai de encontro com o esperado, pois com o aumento da concentração espermática menor será o espaço disponível por célula. Portanto esperava-se uma maior porcentagem de células com a morfologia alterada com o aumento da concentração espermática na palheta de 0,5mL.

Tabela 5 – Média ± erro padrão das alterações morfológicas, expressas em porcentagem (%), de espermatozoides suínos submetidos à criopreservação em cinco diferentes concentrações em palhetas de 0,5mL, avaliados por microscopia óptica de contraste de interferência diferencial de fase

Alteração Morfológica	100x10⁶ sptz/mL	200x10⁶ sptz/mL	300x10⁶ sptz/mL	600x10⁶ sptz/mL	800x10⁶ sptz/mL
Acrossoma	0,12 ± 0,06	0	0,12 ± 0,06	0,08 ± 0,06	0,16 ± 0,09
Cabeça	1,08 ± 0,19	1,08 ± 0,21	1,33 ± 0,26	0,78 ± 0,17	0,87 ± 0,18
Colo	0,12 ± 0,06	0,12 ± 0,06	0,04 ± 0,04	0,23 ± 0,09	0,13 ± 0,07
Peça Intermediária	0,33 ± 0,13	0,28 ± 0,12	0,29 ± 0,12	0,04 ± 0,04	0,04 ± 0,04
Cauda	4,12 ± 1,30	5,12 ± 1,26	4,32 ± 1,23	8,00 ± 1,94	8,12 ± 1,85

Fonte: (RAVAGNANI, G. M., 2015)

8 DISCUSSÃO

Neste experimento foram avaliados os efeitos que a criopreservação em diferentes concentrações na palheta de 0,5 mL podem acarretar no espermatozoide suíno em relação à cinética do movimento e integridade das membranas desta célula. Está descrito na literatura que o processo de criopreservação causa danos nos espermatozoides e que cerca de 40 – 50% das células não sobrevivem à criopreservação (WATSON, 2000). Esses danos podem ser de ordem estrutural, física, bioquímica ou funcional (SALAMON; MAXWELL, 1995). Essas alterações podem resultar em falhas na taxa de fertilidade, diminuição no tamanho da leitegada, uma vez que é imprescindível que todas as estruturas da célula espermática estejam íntegras e funcionais para que ocorra a fertilização e desenvolvimento embrionário (ÕURA; TOSHIMORI, 1990; JOHNSON et al., 2000; ROCA et al., 2003).

Uma das características observadas no sêmen criopreservado é a diminuição da motilidade dessas células. Enquanto a minoria apresenta movimentos progressivos e vigorosos, a maioria exibe um grau de comprometimento na motilidade, e essa qualidade no padrão da motilidade é um fator importante na capacidade do espermatozoide em se locomover através do trato reprodutivo da fêmea e fertilizar o oócito (WATSON 1995; 2000)

As características de motilidade analisadas pelo sistema CASA juntamente com as avaliações tradicionais de sêmen oferecem grandes informações a respeito da qualidade do sêmen antes e após a congelação. É evidente a influência da concentração espermática na maioria das características de movimento espermático deste experimento, onde houve uma diminuição nos valores das variáveis quando a concentração espermática foi aumentada. Fato este registrado em outras espécies, equinos (NASCIMENTO et al., 2008; LOOMIS; CLARK, 1998), caninos (PEÑA; LINDE-FOSBERG, 2000). Entre as características do movimento espermático analisadas neste estudo, não é desejável que o sêmen após a descongelação apresente altos valores de amplitude lateral de cabeça. Este movimento consome muita energia da célula no momento de deslocamento no trato reprodutivo feminino. Segundo Arruda (2000) todas as variáveis do movimento espermático avaliadas aqui

auxiliam no deslocamento do espermatozoide no trato reprodutivo, fato este, importante para que ocorra o encontro dos gametas.

Os resultados de melhor preservação das características de motilidade total e progressiva, foram observados em 100; 200; e 300 x 10⁶ spz/mL. Mas quando a concentração aumenta, como ocorre em 600 e 800 x 10⁶ spz/mL nota-se uma diminuição na motilidade total e progressiva dos espermatozoides.

Outra característica analisada neste trabalho e muito importante para a célula espermática é a integridade das membranas plasmática e acrossomal e o potencial da membrana mitocondrial após a criopresevação diante dos tratamentos estudados. A importância da integridade de cada uma dessas estruturas para o sucesso da inseminação artificial já foi anteriormente descrita. O valor médio da integridade da membrana plasmática (MI) foi prejudicado quando a concentração espermática aumentou numericamente, sendo na concentração de 800x10⁶ spz/mL a menor porcentagem de células com MI. A porcentagem de membrana acrossomal intacta diminuiu conforme o aumento da concentração, o que também foi encontrado no potencial mitocondrial, o valor médio de células com alto potencial mitocondrial também diminuiu conforme o aumento da concentração. Conclui-se a partir destes resultados que, o aumento da concentração espermática tende a prejudicar a integridade dessas estruturas acima citadas. O que também foi citado por Almeida (2006), sobre os danos ocorridos nos espermatozoides durante o processo de congelamento que podem ser ultra-estruturais ou físicos, bioquímicos ou funcionais.

Quanto aos resultados das análises da estabilidade da membrana espermática e peroxidação lipídica, é possível observar que estes se mantêm próximos ($p > 0,05$) nas cinco concentrações estudadas neste trabalho. E quando comparados às variáveis analisadas anteriormente, quanto maior o valor médio da intensidade de fluorescência pior é a condição em que essa célula se encontra. Pois isso ocasiona uma maior desordem da membrana lipídica, fosforilação do aminoácido tirosina, efluxo de colesterol, capacitação e reação acrossomal, eventos estes que diminuem a longevidade do espermatozoide no trato reprodutivo da fêmea (THIENTHAI et al., 2004; VADNAIS; ALTHOUSE, 2011).

A morfologia espermática avaliada por microscopia de contraste por interferência diferencial não foi alterada entre as cinco concentrações estudadas

($p > 0,05$). Observa-se um aumento numérico, mas não significativo, na porcentagem de células com defeito de cauda quando a concentração espermática na palheta de 0,5mL aumenta, o que pode sugerir uma relação com a diminuição da motilidade quando a concentração espermática também é aumentada (100×10^6 spz/mL: $4,12 \pm 1,30$; 200×10^6 spz/mL: $5,12 \pm 1,26$; 300×10^6 spz/mL: $4,32 \pm 1,23$; 600×10^6 spz/mL: $8,00 \pm 1,94$ e 800×10^6 spz/mL: $8,12 \pm 1,85$).

Portanto, através dos resultados obtidos pelas técnicas de congelação e avaliação seminal empregadas neste trabalho temos que a qualidade seminal após a descongelação está diretamente ligada com a quantidade de agentes crioprotetores disponíveis por unidade celular, ou seja, com a proporção crioprotetor/espermatozoide. Durante a congelação, os espermatozoides são direcionados para canais de soluções não congeladas entre cristais de gelo. Estes canais tornam-se progressivamente mais estreitos com a diminuição da temperatura (MAZUR, 1985). Tais canais são importantes durante a criopreservação, pois de acordo com Amann e Pickett (1987) se 15% da água extracelular for mantida não congelada, a possibilidade de sobrevivência da célula à congelação é maior. Possivelmente, os espermatozoides na concentração 100×10^6 spz/mL dispunham de maior proporção de agentes crioprotetores que as células congeladas nas concentrações com 200, 300, 600 e 800×10^6 spz/mL. Quanto maior a quantidade de moléculas crioprotetoras por célula, maior a porcentagem de canais de água não-congelada, resultando em melhor qualidade seminal após a descongelação.

Estes danos causados pela congelação são, de acordo com Watson (1995), decorrentes das mudanças de temperatura a que os espermatozoides são submetidos durante o processo de resfriamento, dos efeitos deletérios dos componentes do meio e do próprio crioprotetor e, finalmente, dos efeitos da descongelação.

CONCLUSÃO

9. CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos, dentro das condições de realização deste experimento, conclui-se que o aumento da concentração espermática na palheta de 0,5mL para a criopreservação do sêmen suíno:

- Prejudica as características de motilidade espermática e na integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial;
- Não prejudica peroxidação lipídica, instabilidade da membrana espermática e defeitos na morfologia espermática.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao avaliar os resultados obtidos durante a realização deste estudo foi possível considerar que o aumento da concentração espermática, na palheta de 0,5mL, interfere com maior intensidade em algumas características da célula espermática, principalmente na motilidade. Então, focando nessas características, tão importantes, é possível visualizar uma queda na porcentagem da motilidade total e progressiva quando a concentração é aumentada de 300 para 600×10^6 espermatozoides por mililitro, o que sugere uma nova investigação para compreender o que ocorre nessa lacuna entre essas duas concentrações

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AITKEN, R. J.; PATTERSON, M.; FISHER, H.; BUCKINGHAM, D. W.; VAN DUIN, M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. **Journal Cell Science**, v. 108, p. 2017-2025, 1995.
- AITKEN, R. J.; RYAN, A. L.; BAKER, M. A.; MCLAUGHLIN, E. A. Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, n. 8, p. 994-1010, 2004.
- ALMEIDA, J. L. **Efeitos de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação de semen equino**. 2006. 77 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.
- ALMLID, T.; HOFMO, P. O. A brief review of frozen semen application under Norwegian AI service conditions. **Reproduction of Domestic Animal**, v. 31, p. 169 – 173, 1996.
- ALVAREZ, J. G.; LASSO, J. L.; BLASCO, L.; NUNEZ, R. C.; HEYNER, S.; CABALLERO, P.; STOREY, B. T. Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile life. **Human Reproduction**, v. 8, p. 1087–1092, 1993.
- ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a model sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. **Journal of Andrology**, v. 13, p. 232-241, 1992.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, p. 145-173, 1987.
- ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. 121 p. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- BAILEY, J.; BILODEAU, J.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 1–7, 2000.
- BAILEY, J. L.; LESSARD, C.; JACQUES, J.; DOBRINSKI, I.; ZENG, W. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. **Theriogenology**, v. 70, p. 1251-1259, 2008.

- BAILEY, J. L.; BURH, M. M. Cryopreservation alters the Ca^{++} flux of bovine spermatozoa. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 74, p. 45-51, 1994.
- BAUMBER, J.; SABEUR, K.; VO, A.; BALL, B. A. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 60, p. 1239-1247, 2003.
- BAVISTER, B. D.; LEIBFRIED, M. L.; LIEBERMAN, G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. **Biology of Reproduction**, v. 28, p. 235-247, 1983.
- BENNEMANN, P. E.; DIEHL, G. N.; MILBRADT, E.; VIDOR, R. M.; FRIES, H. C. C.; WENTZ, I.; BERNARDI, M. L.; BORTOLOZZO, F. P. Artificial insemination of gilts with 1.5 billion sperms stored in different periods associated with different pre ovulatory intervals. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 40, p. 507-510, 2005.
- BERGER, B.; FISCHERLEITNER, F. On deep freezing of boar semen: investigations on the effects of different straw volumes, methods of freezing and thawing extenders. **Reproduction of Domestic Animal**, v. 27, p. 266-270, 1992.
- BREININGER, E.; DESCALZO, A.; ROSSETTI, L.; ABRAMOVICH, D.; BECONI, M. T. Boar sperm functionality is related to α -tocopherol content after freezing-thawing. **Andrologia**, v. 43, p. 409-415, 2011.
- BONET, S.; BRIZ, M.; PINART, E. Light microscopy characterization of sperm morphology. **Microscopy. Annual.**, v. 9, p. 29-31, 1995.
- BRAVO, M. M.; APARICIO, I. M.; GRACIA-HERREROS, M.; GIL, M. C.; PEÑA, F. J. Changes in tyrosine phosphorylation associated with true capacitation and capacitation like state in boar spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 71, p. 88-96, 2005.
- 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 - 8°C. **Dtsch Tieraerztl Wschr**, v. 101, p. 319-22, 1994.
- BURKMAN, L. J. Discrimination between nonhyperactivated and classical hyperactivated motility patterns in human spermatozoa using computerized analysis. **Fertility and Sterility**, v. 55, p. 363-371, 1991.
- BURKS, D. J.; CARBALLADA, R.; MOORE, H. D. M.; SALING, P. M. Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization. **Science**, v. 269, p. 83- 86, 1995.
- BWANGA, C. O. Cryopreservation of boar semen. I: a literature review. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 32, p. 431 - 453, 1991.
- BWANGA, C. O.; EKWALL, H.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Cryopreservation of boar semen. III: ultrastructure of boar spermatozoa frozen ultra-rapidly at various stages of conventional freezing and thawing. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 32, p. 463-471, 1991.

CARVAJAL, G.; CUELLO, C.; RUIZ, M.; MARIA, J.; EMILIO, V.; MARTÍNEZ, A.; ROCA, J. Effects of Centrifugation Before Freezing on Boar Sperm Cryosurvival. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 3, 2004.

CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; RAPAHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P. Simultaneous assesment of plasmatic, acrosomal and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n.3, p. 536-543, 2010.

CHANG, H.; SUAREZ, S. S. Two distinct Ca(2+) signaling pathways modulate sperm flagellar beating patterns in mice. **Biology of Reproduction**, v. 85, p. 296-305, 2011.

CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. **Molecular Reproduction Device**, v. 59, p. 451–458, 2001.

COLENBRANDER, B.; RATHI, R.; BEVERS, M. M.; GADELLA, B. M. Capacitation related changes in stallion spermatozoa. In: Proceedings of a workshop entitled From Epidiymis to embryo. **Havemeyer Foundation Monograph Series**, n. 6, p. 24, 2001.

COOK, S. P.; BANCOCK, D. F. Activation of Ca²⁺ permeability by cAMP is iso coordinated through the pH increase induced by speract. **Journal of Biological Chemistry**, v. 22, p.408-422, 1993.

CÓRDOVA-IZQUIERDO, A.; MUÑOZ-MENDOZA, R.; CÓRDOVA-JIMÉNEZ, S. Características del semen de verraco y su evaluación práctica. *Porcinocultura*, 2004.

COTTORELLO, A. C. P.; HENRY, M. Princípios da criopreservação, congelação e avaliação do sêmen eqüino (Revisão de Literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 1, p. 14-25, 2002.

DE ANDRADE, A. F. C.; ZAFFALON, F. G.; CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; TARRAGÓ, O. F. B.; MARTINS, S. M. M. K.; ALONSO, M. A.; ARRUDA, R. P. Addition of seminal plasma to phost-thawiequine semen: what is the effect on sperm cell viability? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 682-686, 2011.

DE LAMIRANDE, E.; LECLERC, P.; GAGNON, C. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, p. 175–194, 1997.

DE LAMIRANDE, E.; TASI, C.; HARAKAT, A.; GAGNON, C. Involvement of reactive oxygen species in human sperm acrosome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluid ultra filtrates. **Journal of Andrology**, v. 19, p. 585–594, 1998.

DEMOTT, R. P.; SUAREZ, S. S. Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 779 - 785, 1992.

DIDION, B. A.; BRAUN, G. D.; DUGGAN, M. V. Field fertility of frozen boar semen: a retrospective report comprising over 2600 AI services spanning a four year period. **Animal Reproduction Science**, v. 137, p. 189–196, 2013.

EKWALL, H.; HERNANDEZ, M.; SARAVIA, F.; RODRIGUEZ- MARTINEZ, H. Cryo scanning electron microscopy (Cryo-SEM) of boar semen frozen in medium-straws and MiniFlatPacks. **Theriogenology**, v. 67, n. 9, p. 1463–1472, 2007.

ERIKSSON, B. M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in FlatPacks and Maxi-straws. **Animal Reproduction Science**, v. 63, p. 205-220, 2000.

ERIKSSON, B. M.; PETERSSON, H.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Field fertility with exported boar semen frozen in the new FlatPack container. **Theriogenology**, v. 58, p. 1065 – 1079, 2002.

ERIKSSON, B. M.; VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A.; ROCA, J.; LUCAS, X.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effects of holding time during cooling and of type of package on plasma membrane integrity, motility and in vitro oocyte penetration ability of frozen-thawed boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 55, p. 1593-1605, 2001.

EVANS, J. P. Sperm-egg interaction. **Annual Review of Physiology**, v. 74, p. 477-502, 2012.

FISER, P. S.; FAIRFULL, R. W. Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5 ml straws. **Molecular Reproduction and Development**, v. 25, p. 123-129, 1990.

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1469, p. 197–235, 2000.

FLESCH F. M.; COLENBRANDER, B.; VAN GOLDE, L. M. G.; GADELLA, B. M. Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 262, p. 787-792, 1999.

FRASER, L.; STRZEZEK, J. Effect of different procedures of ejaculate collection, extenders and packages on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 317-329, 2007.

GADELLA, B. M.; HARRISON, R. A. P. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. **Development**, v. 127, p. 2407-2420, 2000.

GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozoides y plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. E. (Ed.). **Reproducción e inseminación artificial en animales**. 6 ed. México: McGraw-Hill Interamericana, 1996. p 158–179.

GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 12, p. 131-147, 1996.

GREEN, C. E.; WATSON, P. F. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. **Reproduction**, v. 122, p. 889-898, 2001.

- GUTIÉRREZ-PÉREZ, O.; JUÁREZ-MOSQUEDA, M. D. L.; CARVAJAL, S. U.; ORTEGA, M. E. T. Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity. **Cryobiology**, v. 58, p. 287–292, 2009.
- HANSEN, C.; SRIKANDAKUMAR, A.; DOWNEY, B. R. Presence of follicular fluid in the porcine oviduct and its contribution to the acrosome reaction. **Molecular Reproduction and Development**, v. 30, p. 148-153, 1991.
- HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, n.1, p. 73-88, 1990.
- HAMMERSTED, R. H.; DRICHTON, E. G.; WATSON, P. F. Comparative approach to sperm cryopreservation: does cell shape and size influence cryo-survival? In: PROCEEDINGS OF SOCIETY OF THERIOGENOLOGY, 1991, San Diego. **Proceedings...** Hastings, NE: Society for Theriogenology, 1991. p. 8-11.
- HARRISON, R. A. P.; ASHWORTH, P. J. C.; MILLER, N. G. A. Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, p. 378- 391, 1996.
- HERNANDEZ, M.; ROCA, J.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; MUINO-BLANCO, T.; CEBRIAN-PEREZ, J. A.; VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A. 2007. Cryosurvival and in vitro fertilizing capacity post thaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars. **Journal of Andrology**, v. 28, p. 689–697, 2007.
- HO, H.; SUAREZ, S. S. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. **Reproduction**, v. 122, p. 519-526, 2001.
- HOLT, W. V.; NORTH, R. D. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 414–424, 1994.
- HOLT, W.V. Basic aspects on frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 3–22, 2000.
- HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000.
- HU, J. H.; LI, Q. W.; JIANG, Z. L.; LI, W. I. Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing–thawing. **Cryobiology**, v. 57, p. 257–262, 2008.
- HUNTER, R. H. F. Capacitation of mammalian spermatozoa: a physiological perspective set against presumptive maturation in vitro. In: WORKSHOP ENTITLED

FORM EPIDIDYMISS TO EMBRYO, 2001. New Orleans. Proceedings... Reino Unido: Havemeyer Foundation, 2001. p. 21-23., (Monograph Series, n. 6).

JOHNSON, L. A. Current developments in swine semen: preservation, artificial insemination and sperm sexing. In: IPVS CONGRESS, 15., 1998, Inglaterra. **Proceedings...** 1998. p. 225 – 229.

JOHNSON, L. A.; AALBERS, J. G.; WILLEMS, C. M.; SYBESMA, W. Use of spermatozoa for artificial insemination. I. Fertilizing capacity of fresh and frozen spermatozoa in sows on 36 farms. **Journal of Animal Science**, v. 52, p. 1130 - 1136, 1981.

JOHNSON, L. A.; WEITZE, K. F.; FISER, P.; MAXWELL, W. M. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 143–172, 2000.

JUAREZ, J. D.; PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A.; ROCA, J. Boar semen can tolerate rapid cooling rates prior to freezing. **Reproduction and Fertility**, Device, v. 23, p. 681–690, 2011.

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

KUMAR, S.; MILLAR, J. D.; WATSON, P. F. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. **Cryobiology**, v. 46, p. 246 - 253, 2003.

LARSSON, K.; EINARSSON, S.; SWENSSON, T. The development of a practicable method for deep freezing of boar spermatozoa. **Nord Veterinary Medicine Journal** título por extenso, v. 29, p. 112–118, 1977.

LOOMIS, R. P.; CLARK, J. S. Motion characteristics of frozen-thawed equine spermatozoa packed in 0,5 mL straws at various concentrations. In: Society for Theriogenology. Proceedings for annual Meeting, Baltimore, 1998, p.225.

MAZUR, P. Cryobiology: the freezing of biological systems. **Science**, v. 168, p. 939-949, 1970.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal Physiology**, v.16, p.125-142, 1984.

MAZUR, P.; LEIBO, S. P.; SEIDEL JR., G. E. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. **Biology of Reproduction**, v. 78, p. 2 - 12, 2008.

MC KINNON, A.O. Artificial Insemination of cooled, transported and frozen semen. **Australian Equine Veterinary Journal**, v.14, n. 4, p.156-175, 1996.

MEDRANO, A.; WATSON, P. F.; HOLT, W. V. Importance of cooling rate and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. **Reproduction**, v. 123, p. 315 - 322, 2002.

NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C.; ALONSO, M. A.; CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P. Effects of sperm concentration and straw volume on motion characteristics and plasma, acrosomal, and mitochondrial membranes of equine cryopreserved spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, p. 351-358, 2008.

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. *Human Reproduction*, v. 5, p. 209–211, 1990.

NUTRIENT REQUIREMENTS OF SWINE. 10th revised edition. 189 p. National Academy of Sciences, Washington DC, 1998.

O'FLAHERTY, C. M.; BEORLEGUI NB, B. E.; CONI, M.T. Reactive oxygen species requirement for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. **Theriogenology**, v. 52, p. 289–301, 1999.

ORTEGA-FERRUSOLA, C.; SOTILLO-GALÁN, Y.; VARELA-FERNÁNDEZ, E.; GALLARDO-BOLAÑOS, J. M.; MURIEL, A.; GONZÁLEZ-FERNANDEZ, L.; TAPIA, J. A.; PEÑA, F. J. Detection of “Apoptosis-like” changes during the cryopreservation process in equine sperm. **Journal of Andrology**, v. 29, p. 213-221, 2008.

ÕURA, C.; TOSHIMORI, K. Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. **International Review of Cytology**, v. 122, p. 105-151, 1990.

PAQUIGNON, M.; COUROT, M. Fertilizing capacity of frozen boar spermatozoa. In: 8th International Congress on Animal Reproductive Artificial Insemination, Cracow, Poland., 1976, v. 4, p. 1041–1044.

PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, p.209-22, 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. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 112, p. 95–105, 1998.

PEÑA, A.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v. 54, p. 703 – 718, 2000.

PEÑA, F.J.; SARAVIA, F.; NUÑEZ-MARTINEZ, I.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Do different portions of the boar ejaculate vary in their ability to sustain cryopreservation? **Animal Reproduction Science**, v. 93, p.101-113, 2006.

PINART, E.; SANCHO, S.; BRIZ, M. BONET, S.; GARCÍA, N. Characterization of the semen quality of postpuberal boars with spontaneous unilateral abdominal cryptorchidism on the right side. **Animal Reproduction Science**, v. 55, p. 269-278, 1999.

PURSEL, V. G.; JOHNSON, L. A. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. **Journal of Animal Science**, v. 40, p. 99 - 102, 1975.

RATHI, R.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M.; GADELLA, B. M. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 462-470, 2001.

REVELL, S.G.; ECOT, P.; DECUADRO-HANSEN, G.; CAMUS, A. Evaluation of a cushioned centrifugation technique for processing equine semen for freezing. In: proceedings of the 14th Meeting European A.I.. Lugo, Spain, 2002.

RINGWELSKI, J. M.; BEEVER, J. E.; KNOX, R. V. Effect of interval between inseminations when using frozen-thawed boar sperm on fertility and fetal paternity in mature gilts. **Animal Reproduction Science**, v. 137, p. 197-204, 2013.

ROBERTSON, L.; WATSON, P. F.; PLUMMER, J. M. Prior incubation reduces calcium uptake and membrane disruption in boar spermatozoa subjected to cold shock. **Cryo Letters**, v. 9, p. 286-293, 1988.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; WALLGREN, M. Advances on boar semen cryopreservation. **Veterinary Medicine Internacional**, v. 2011, p. 01-05, 2011.

ROCA, J.; CARVAJAL, G.; LUCAS, X.; VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A. Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. **Theriogenology**, v. 60, p. 77-87, 2003.

ROCA, J.; VÁZQUEZ, J. M.; GIL, M. A.; CUELLO, C.; PARRILLA, I.; MARTÍNEZ, E. A. Challenges in pig artificial insemination. **Reproduction of Domestic Animals**, v.41, p.43-53, 2006.

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

SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; NAGY, S.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effects on sperm viability. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1320-1333, 2005.

SAS. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS user's guide**: statistical analysis system. Release 9.3, Cary, NC: SAS Institute, 2002.

SCHIMIDT, H.; KAMP, G. Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted analysis. **Reproduction and Fertility**, v. 128, p. 171-179, 2004.

SERRES, C.; RODRÍGUEZ, A.; ALVAREZ, A. L.; SANTIAGO, I.; GABRIEL, J.;

GÓMEZ-CUÉTARA, C.; MATEOS, E. Effect of centrifugation and temperature on the motility and plasma membrane integrity of Zamorano-Leone's donkey semen. **Theriogenology**, v. 58, p. 329–332, 2002.

SHEKARRIZ, M.; DE WIRE, D. M.; THOMAS, A. J.; AGARWAL, A. A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. **European Urology**, v. 28, p. 31–35, 1995.

SUAREZ, S. S.; KATZ, D. F.; OVERSTREET, J. W. Movement characteristics and acrosomal status of rabbit spermatozoa recovered at the site and time of fertilization. **Biology of Reproduction**, v. 29, p. 1277–1287, 1983.

TIENTHAI, P.; JOHANNISSON, A. B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm capacitation in the porcine oviduct. **Animal Reproduction Science**, v. 80, p. 131 – 146, 2004.

THURSTON, L. M.; SIGGINS, K.; MILEHAM, A. J.; WATSON, P. F.; HOLT, W. V. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. **Biology of Reproduction**, v.66, p. 545–554, 2002.

VADNAIS, M. L.; ALTHOUSE, G. C. Characterization of capacitation, cryoinjury, and the role of seminal plasma in porcine sperm. **Theriogenology**, v. 76, p. 1508 – 1516, 2011.

VADNAIS, M. L.; KIRKWOOD, R. N.; SPRECHER, D. J.; CHOU, K. Effect of extender, incubation temperature and added seminal plasma on capacitation of cryopreserved, thawed boar sperm as determined by chlortetracycline staining. **Animal Reproduction Science**, v. 90, p. 347–354, 2005.

VADNAIS, M. L.; ROBERTS, K. P. Effects of seminal plasma on cooling-induced capacitative changes in boar sperm. **Journal of Andrology**, v. 28, p. 416–422, 2007.

VAZQUEZ, J. M.; ROCA, J.; GIL, M. A.; CUELLO, C.; PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J. L.; MARTÍNEZ, E. A. New developments in low-dose insemination technology. **Theriogenology**, v. 70, p. 1216 - 1224, 2008.

VELLOSO, N. M. **Congelação e efeito do meio sobre as características físico-químicas do sêmen suíno no inverno e verão**. 2011. 97 p. Tese (Doutorado)-, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2011.

VISCONTI, P. E.; BAILEY, J.; MOORE, G.; PAN, D.; OLDS-CLARKE, P.; KOPF, G. Capacitation of mouse spermatozoa. Part1. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. **Development**, v. 121, p. 1129–1137, 1995

VISCONTI, P. E.; KOPF, G. S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1–6, 1998.

WABERSKI, D.; WEITZE, K. F.; GLEUMES, T.; SCHAWRZ, M.; PETZOLD, R. Effect of time of insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen. **Theriogenology**, v. 42, p. 831–840, 1994.

WATSON, P. F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 62, p. 483- 492, 1981.

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

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with crypreserved sêmen. *Animal Reproduction Science*, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

WATSON, P. F.; MORRIS, G. J. Cold shock injury in animal cells. **Symposium of Society Experimental Biology**, v. 41, p. 311-340, 1987.

WEITZE, K. F.; RATH, D.; BARON, G. New aspects of preservation of boar sperm by deep freezing in plastic tubes. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 94, p. 485-488, 1987.

WISHWANATH, R.; SHANNON, P.; CURSON, B. Cationic extracts of egg yolk and their effects on motility, survival and fertilizing ability of bull sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 29, p. 185–94, 1992.

WHITE, D. R.; AITKEN, R. J. Relationship between calcium cyclic AMP, ATP and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. **Gamete Research**, v. 22, p. 163-177, 1989.

WHITE, I. G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reproduction and Fertility Device**, v. 5, p. 639–658, 1993.
WICKINGS, E. J.; FREISCHEN, C. W.; LANGER, K.; NIESCHLAG, E. Heterologous ovum penetration test and seminal parameters in fertile and infertile men. **Journal of Andrology**, v. 4, n. 4, p. 261, 1983.

WONGTAWAN, T.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; CABALLERO, I.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Fertility after deep intra-uterine artificial insemination of concentrated low-volume boar semen doses. **Theriogenology**, v. 65, p. 773 – 787, 2006.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The Physiology of reproduction**. New York: Raven Press, p. 189-317, 1994.

ZANEVELD, L. J. D.; DE JONGE, C. J.; ANDERSON, R. A.; MACK, S. R. Human sperm capacitation and the acrosome reaction. **Human Reproduction**, v. 9, p. 1265-1274, 1991.

ZÚCCARI, C. E. S. N. Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina. **1998**. 121 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, 1998.

ANEXO A

TALP SPERM (Bavister *et al.*, 1983)

1. Solução de sais de TALP (para preparar 500mL)

Componentes:

- NaCl.....2,100g
- KCl.....0,935g
- NaHCO₃.....1,05g
- NaH₂PO₃.....0,025g
- CaCl₂H₂O.....0,145g
- MgCl₆H₂O.....0,04g
- Hepes.....3,25g

Preparo:

- Diluir CaCl₂H₂O e MgCl₆H₂O em 200mL de água Milli-Q;
- Os demais sais devem ser diluídos em 200mL de água Milli-Q;
- Combinar as duas soluções e completar para 500mL;
- Filtrar;
- Manter resfriado.

2. Solução dos metabólitos glicosados

A. Solução estoque (para preparar 500mL)

Componentes:

- Glicose.....2,500g
- Lactato de sódio.....9,25mL
- Piruvato de sódio.....70mg
- Pen-Strep.....12,5mL

Preparo:

- Dissolver todos os componentes;
- Aliquotar (alíquotas de 5mL);
- Manter em freezer (-20°C).

B. Solução trabalho

- Pipetar 45mL da solução de sais de TALP;
- Ajustar pH para 7,4;
- Adicionar 5mL da solução estoque de metabólitos glicosados;
- Filtrar em filtro de 0,45µm;
- Aliquotar (alíquotas de 300µL);
- Manter em freezer (-20°C).

3.Preparo no dia**Componentes:**

- Solução de sais de TALP.....10mL
- Solução de trabalho de metabólitos glicosados.....200µL
- Albumina Sérica bovina (BSA).....100mg

Preparo:

- Dissolver BSA e metabólitos glicosados em TALP e incubar por 10 minutos
- Ajustar o pH para 7,4
- Filtrar em filtro de 0,45µm

ANEXO B - TALP SPERM MODIFICADO

1. Solução de Sais de TALP (para preparar 500mL)

Componentes:

- NaCL.....2,100g
- KCL.....0,935g
- NaH₂PO₄.....0,025g
- MgCl₆H₂O.....0,040g
- Hepes.....3,250g

Preparo:

- Diluir MgCl₆H₂O em 200 mL de água Mili-Q
- Diluir outros sais em 200 mL de água Mili-Q
- Combinar as duas soluções e completar para 500 mL
- Manter Refrigerado

2. Solução dos Metabólitos Glicosados

2.1 Solução Estoque (para preparar 50 mL)

Componentes:

- Glicose.....2,50g
- Lactato de Sódio.....9,25 mL
- Piruvato de Sódio.....70 mg
- Pen-Strep[®]12,5 mL

Preparo:

- Dissolver todos os componentes
- Aliquotar (alíquotas de 5 mL) e manter em freezer (-20°C)

2.2.Solução Trabalho

Preparo

- Colocar 45 mL da solução de Sais de TALPm
- Colocar 5 mL da solução estoque de Metabólitos Glicosados
- Aliquotar (alíquotas de 250µL)
- Ajustar pH para 7,4
- Manter em freezer (-20°C)

3.TALP *SPERM* MODIFICADO (preparo no dia)

Componentes:

- 10 mL da solução de Sais de TALPm
- 200 µL da solução trabalho de Metabólitos Glicosados

Preparo:

- Misturar componentes e incubar por 10 minutos
- Ajustar o pH para 7,4

ANEXO C**FORMOL SALINO 4%**Componentes: **Componentes****Quantidade para fazer****1000mL****Formol 37%..... 40mL****DPBS/Solução salina 960mL**

ANEXO D - PREPARO DAS SONDAS FLUOROSCENTES

HOESCHT 33342

Molecular Probes

Solução estoque (25 mg/ml)

- Diluir o Hoescht 100mg em 4mL de DMSO para ficar na concentração de 25mg/mL (solução estoque);
- Aliquotar em microtubos e armazenar a -20°C.

Solução de trabalho (0,5mg/ml)

- Adicionar a 980µl de DPBS, 20µl de H3342 (solução estoque, 25mg/ml) para ficar a concentração de 0,5mg/mL (solução trabalho);
- Aliquotar em microtubos e armazenar a -20°C.

IODETO DE PROPÍDEO (PI)

Propidium iodide, 28,707-5- 25mg, Sigma-Aldrich

Solução estoque 25mg/mL

- Adicionar 1mL de DMSO à 25mg de PI;
- Aliquotar em microtubos e armazenar a -20°C.

Solução trabalho 0,5mg/mL

- Adicionar 20µL de PI (solução estoque, 25mg/mL) a 980µL de PBS;

Aliquotar em microtubos e armazenar a -20°C.

FITC-PSA

Lectina obtida de *Pisum sativum*, L0770, Sigma-Aldrich

Solução de trabalho (100µg/ml)

- No frasco do FITC-PSA acrescentar 1 ml de DPBS e homogeneizar;
- Em tubo falcon coberto com papel alumínio adicionar 18mL de DPBS, 1mL de solução de azida de sódio 1% e 1mL da solução do FITC-PSA homogeneizada;
- Aliquotar em microtubos e armazenar a -20°C.

SOLUÇÃO ESTOQUE AZIDA DE SÓDIO 1%

-Adicionar 0,2g de azida de sódio (Sigma- Aldrich, S8032) a 20mL de DPBS.

JC-1

T3168- 5mg, Molecular Probes

Solução estoque 1 mg/ml (153mM)

-Adicionar 5mL de DMSO a 5mg de JC-1 ficando na concentração de 153mM.

Solução de trabalho(153 µM)

- Adicionar 1mL de JC-1 153mM (solução estoque) a 9mL de DMSO para ficar na concentração de 153µM;
- Aliquotar em microtubos e armazenar a -20°C.

ANEXO E

SETUP SISTEMA CASA (programa SCA - Sperm Class Analyser; MICROPTIC, Barcelona, Espanha)

Característica	Ajuste
Número de imagens adquiridas.....	25
Taxa de aquisição de imagens (por segundo).....	24
Tamanho mínimo da célula.....	3 μm^2
Valor de corte de VCL para células rápidas	> 75 $\mu\text{m/s}$
Valor de corte de VCL para células lentas.....	< 45 $\mu\text{m/s}$
Retilinearidade (STR), Limiar.....	> 80%
Movimento circular (LIN).....	< 50%
Temperatura.....	37°C

ANEXO F

Quadro de Análise de Variância para o delineamento em bloco

Fonte de variação	Graus de liberdade
Tratamento	4
Cachaço (bloco)	4
Resíduo	17
Total	25