

DIEGO FEITOSA LEAL

Influência do plasma seminal oriundo da fração rica do ejaculado sobre as características estruturais e na cinética do espermatozoide suíno conservado sob refrigeração a 17⁰C por 72 horas

Pirassununga

2016

DIEGO FEITOSA LEAL

Influência do plasma seminal oriundo da fração rica do ejaculado sobre as características estruturais e na cinética do espermatozoide suíno conservado sob refrigeração a 17⁰C por 72 horas

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

Departamento:

Reprodução Animal

Àrea de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. André Furugen Cesar de Andrade

Pirassununga

2016

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T.3271 FMVZ	<p>Leal, Diego Feitosa</p> <p>Influência do plasma seminal oriundo da fração rica do ejaculado sobre as características estruturais e na cinética do espermatozoide suíno conservado sob refrigeração a 17°C por 72 horas / Diego Feitosa Leal. -- 2016. 78 f. il.</p> <p>Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, Pirassununga, 2016.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.</p> <p>Área de concentração: Reprodução Animal.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. André Furugen Cesar de Andrade.</p> <p>1. Plasma seminal. 2. Sêmen suíno refrigerado. 3. Citometria de fluxo. I. Título.</p>
----------------	--

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto intitulado "Influência do plasma seminal oriundo da fração rica do ejaculado sobre as características estruturais e na cinética do espermatozoide suíno conservado sob refrigeração a 17 C por 72 horas", protocolado sob o CEUA nº 1698150915, sob a responsabilidade de **André Furugen César de Andrade** e equipe; **Diego Feltosa Leal** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) em reunião de 09/12/2015.

We certify that the proposal "influence of seminal plasma derived from the rich fraction of the ejaculate on the structural characteristics and the kinetics of the swine sperm stored under refrigeration at 17 C for 72 hours", utilizing 6 Swines (6 males), protocol number CEUA 1698150915, under the responsibility of **André Furugen César de Andrade and team; Diego Feltosa Leal** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of São Paulo (CEUA/FMVZ) in the meeting of 12/09/2015.

Vigência da Proposta: de 10/15 a 11/15

Área: Reprodução Animal

Procedência: Repetição interna (numeração dos animais: 1,2,3,4,5,6)

Especie:	Suínos	sexo:	Machos	idade:	230	N:	6
Linhagem:	Híbridos			Peso:	200		

Resumo: O presente projeto pretende avaliar os efeitos do plasma seminal, oriundo da fração rica do ejaculado, sobre a cinética espermática, integridade das membranas plasmática e acrosomal e peroxidação lipídica das membranas do espermatozoide suíno armazenado sob refrigeração a 17°C por 72 horas. Serão obtidos 6 ejaculados de 6 cachorros. Em seguida o sêmen in natura será avaliado quanto às características da motilidade pelo sistema computadorizado de análise do sêmen, morfologia espermática por contraste de interferência diferencial e concentração espermática. Após essa primeira avaliação, os ejaculados serão acondicionados em tubos cônicos de 50 mL para serem divididos em três tratamentos, a saber: não centrifugado (NC), centrifugado e com o plasma seminal retirado pós-centrifugação (CS) e centrifugado ressuspensionado (CR). A força de centrifugação utilizada será de 600xg por 20 minutos. Todos os tratamentos serão submetidos à diluição em meio BTS para que se obtenha uma concentração de 30×10^6 espermatozoides por mililitro (mL) atingindo um volume final de 50 mL. Em seguida, as amostras permanecerão por 90 minutos em temperatura ambiente e protegidas da luz antes de serem armazenadas. As doses com os diferentes tratamentos serão acondicionadas à temperatura de 17°C e serão avaliadas nos intervalos 0 (90 min pós-diluição), 24, 48 e 72 horas para os seguintes parâmetros: características da motilidade (CASA), integridade das membranas plasmática e acrosomal e peroxidação das membranas espermáticas por citometria de fluxo. Os tratamentos serão submetidos à análise de variância (PROC GLM), empregando-se o programa SAS (1998). Quando o principal efeito for significativo, as médias serão comparadas pelo teste de Tukey.

São Paulo, 05 de janeiro de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: LEAL, Diego Feitosa

Título: **Influência do plasma seminal oriundo da fração rica do ejaculado sobre as características estruturais e na cinética do espermatozoide suíno conservado sob refrigeração a 17⁰C por 72 horas**

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: _____

À minha família

AGRADECIMENTOS

Para aquele leitor mais curioso que, porventura, um dia se interessar a ler essas singelas linhas, saiba que “ A gratidão é virtude das almas nobres”, deste modo, não poderia deixar de demonstrar meu reconhecimento à algumas pessoas:

À meus pais, por todo apoio e amor que me dedicam e por compreenderem a minha ausência; mas saibam que apesar da distância física sempre os carrego no coração. Obrigado por tudo e por todo o sacrifício que fazem para que eu possa estudar. Não preciso me estender muito já que gratidão se demonstra por atitudes e não por simples palavras.

Ao meu orientador, Prof Dr André Furugem Simprão de Andrade, por ser meu orientador no sentido *Lato* da palavra, pela amizade, discussões (muitas vezes inflamadas), risadas, ensinamentos e que apesar da minha rebeldia e grandes limitações não desistiu.

À Dra Simone (sobrenome muito extenso para ser citado) que considero, mesmo que não oficialmente, minha co-orientadora e PROFESSORA, pois há muitos que carregam o título na frente do nome mas não fazem nem a metade do que ela faz. Só tenho a agradecer por todos os ensinamentos, paciência e por ter dito um dia que eu poderia te considerar como amiga.

Ao Cabral, se cheguei até aqui devo inteiramente a este idealista que tem por prazer e vocação despertar o interesse pelo conhecimento. Meu grande amigo.

Ao Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, que para mim é um exemplo de profissionalismo, ética e caráter a ser seguido. Obrigado por nossas conversas, sempre sai delas com algum conhecimento a mais.

À Prof. Dr Eneiva Carla Carvalho Celeghini, sempre muito gentiu; ela não sabe mas comecei a entender um pouco sobre a fisiologia do espermatozoide graças a uma aula ministrada por ela.

Aos colegas de equipe, Gisele, Mariana, Bruno, todos os Ics, Fabinho, chiquinho, pois se conseguir fazer alguma coisa foi com a ajuda de vocês, como já disse, só fui no vácuo de vocês. Gisele sempre me resgatando dos apuros da vida, não tenho nem como retribuir por toda a ajuda amiga (rs). Mariana auxiliando meus primeiros passos aqui em Pirassununga, me levando pra baixo e pra cima de carro tentando fazer que a minha adaptação aqui fosse fácil.

Ao Cleyton e Harumi pela eficiência com que sempre nos atende.

À FAPESP (2014/20768-3) pela bolsa concedida.

RESUMO

LEAL, D. F. **Influência do plasma seminal oriundo da fração rica do ejaculado sobre as características estruturais e na cinética do espermatozoide suíno conservado sob refrigeração a 17^oC por 72 horas.** [Influence of seminal plasma derived from the rich fraction of the ejaculate on the structural characteristics and the kinetics of the swine sperm stored under refrigeration at 17^oC for 72 hours]. 2016. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

O plasma seminal é o constituintes não celular do sêmen suíno e contém uma série de componentes orgânicos e inorgânico que desempenham ações variadas tanto no trato reprodutivo masculino como no feminino. No entanto, este fluido de constituição complexa, exerce ações ambíguas sobre os espermatozoides suínos, pois pode atuar ao mesmo tempo de forma benéfica ou deletéria sobre a viabilidade destas células. Nesse sentido, alguns estudos sugerem que este não é o melhor meio para a conservação de espermatozoides. Desta forma o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do plasma seminal sobre a integridade das membranas plasmática e acrossomal e o potencial de membrana mitocondrial do espermatozoide suíno armazenado sob refrigeração a 17^oC por 72 horas. Para tanto, foram obtidos 4 ejaculados de 6 cachacos. Em seguida o sêmen *in natura* foi avaliado quanto às características da motilidade pelo sistema computadorizado de análise do sêmen, morfologia espermática por contraste de interferência diferencial e concentração espermática. Após essa primeira avaliação, os ejaculados foram acondicionados em tubos cônicos de 50 mL para serem divididos em três tratamentos, a saber: não centrifugado (NC), centrifugado e com o plasma seminal retirado pós-centrifugação (CS) e centrifugado resuspendido (CR). A força de centrifugação utilizada foi de 500xg por 10 minutos. Todos os tratamentos foram submetidos à diluição em meio BTS para que se obtenha uma concentração de 30 x 10⁶ espermatozoides por mililitro (mL). Em seguida, as amostras permaneceram por 90 minutos em temperatura ambiente e protegidas da luz antes de serem armazenadas. As doses com os diferentes tratamentos foram acondicionadas à temperatura de 17^oC e foram avaliadas nos intervalos 0 (90 min pós-diluição), 24, 48 e 72 horas para os seguintes parâmetros: características da motilidade (CASA), integridade das membranas plasmática e acrossomal, estabilidade da membrana plasmática e peroxidação das membranas espermáticas (citometria de fluxo). Os tratamentos foram submetidos à análise de variância (PROC GLM), empregando-se o programa SAS (1998). Quando o principal efeito foi significativo, as médias foram

comparadas pelo teste de Tukey-kramer ao nível de 5% de significância. Os resultados do presente estudo mostram que a ausência do plasma seminal foi deletéria para algumas características de motilidade, o mesmo ocorreu para a integridade das membranas plasmática e acrossomal uma vez que houve diminuição na percentagem de células espermáticas com membrana plasmática íntegra e acrossomo íntegro no tratamento sem plasma seminal. A peroxidação lipídica das membranas e a manutenção da estabilidade da membrana plasmática não foram influenciadas pelo tratamento. Assim, conclui-se que a presença do plasma seminal em doses inseminantes refrigeradas por 72 h é importante para a manutenção das características de motilidade e para a integridade das membranas plasmáticas e acrossomal.

Palavras-chave: Plasma seminal. Sêmen suíno refrigerado. Citometria de fluxo.

ABSTRACT

LEAL, D. F. **Influence of seminal plasma derived from the rich fraction of the ejaculate on the structural characteristics and the kinetics of the swine sperm stored under refrigeration at 17⁰C for 72 hours.** [Influência do plasma seminal oriundo da fração rica do ejaculado sobre as características estruturais e na cinética do espermatozoide suíno conservado sob refrigeração a 17⁰C por 72 horas]. 2016. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

The present study aimed to evaluate the effects of seminal plasma, from the rich fraction of the ejaculate, on kinetics, plasma and acrosome membrane integrity, lipid peroxidation and capacitation of extended liquid boar semen stored under refrigeration at 17° C for 72 hours. For this purpose, four ejaculates from each of six boars were used. Shortly after collection and raw semen evaluation, ejaculates were extended in BTS medium and then assigned to one of three treatments, as follows: non-washed seminal plasma (NWSP), washed-seminal plasma (WSP) centrifuged with own seminal plasma suspended (CWSSP). All treatments were evaluated for sperm motility parameters by the sperm class analyzer (SCA). Plasma and acrosome membrane integrity, lipid peroxidation and sperm capacitation were evaluated by flow cytometry at 0, 24, 48 and 72 hours post dilution. The mean percentage of sperm motility (total and progressive) were lower ($p<0.05$) in the WSP treatment. There was an increase ($p<0.05$) in the percentage of sperm with damaged acrosome and damage plasma membrane in the WSP treatment. Membrane lipid peroxidation did not differ ($p>0.05$) irrespective of treatment nor did sperm capacitation, which was similar ($p>0.05$) among treatments. Our results show that seminal plasma from the sperm rich fraction is important to maintain adequate structural and functional characteristics of extended liquid boar and should be present in seminal doses throughout the period of store.

Keywords: Seminal plasma; extended liquid boar semen; flow cytometry

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema experimental das análises realizadas.....	33
Figura 2 -	Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos (LATES, FMVZ-USP).....	35
Figura 3 -	Citômetro de Fluxo BDFACSAria® (LMMD, FZEA-USP).....	36
Figura 4 -	Alojamento dos cachacos no Núcleo de Pesquisa em Suínos (FMVZ-USP).....	37
Figura 5 -	(A) Higienização do divertículo prepucial e (B) coleta de sêmen através do método da mão enluvada.....	38
Figura 6 -	Contagem espermática por meio da utilização da câmara de Neubauer, aumento de 400x.....	39
Figura 7 -	Sistema de análise computadorizada do sêmen (SCA®, Microptic S.L., Barcelona, Espanha) instalado em um computador com camera acoplada a um microscópio de epifluorescência (Nikon®, Modelo Eclipse NI-U) para captura de imagens.....	41
Figura 8 -	Imagem gerada pelo programa de análise computadorizada do sêmen pelo programa Sperm Class Analyzer (SCA®, Microptics S. L., Barcelona, Espanha).....	41
Figura 9 -	Gráficos gerados a partir do software FACSDiva 6.1, das análises de integridade de membranas plasmática e acrossomal.....	43
Figura 10 -	Gráficos gerados a partir do software FACSDiva 6.1, da sonda de peroxidação lipídica pela espermática na citometria de fluxo.....	45
Figura 11 -	Gráficos gerados a partir do software FACSDiva 6.1, da sonda Merocianina na citometria de fluxo.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Média \pm erro padrão das características da cinética espermática avaliadas pelo programa Sperm Class Analyser (SCA) da Motilidade total (MT); motilidade progressiva (MP) e frequência de batimento flagelar (BCF, Hz) do espermatozoide suíno refrigerado por 72 h.....	51
Tabela 2 -	Média \pm erro padrão das características da cinética espermática avaliadas pelo programa Sperm Class Analyser (SCA) Motilidade total (MT); motilidade progressiva (MP), velocidade de curvilínea (VCL), velocidade progressiva (VSL); velocidade de trajeto (VAP); linearidade (LIN); retilinearidade (STR); amplitude lateral da cabeça (ALH); frequência de batimento flagelar (BCF, Hz) do comportamento do espermatozoide suíno refrigerado no período de 72 h.....	51
Tabela 3 -	Média \pm erro padrão da população de células AIMI (Acrossomo Íntegro e Membrana Plasmática Íntegra), AIML: (Acrossomo Íntegro e Membrana Lessada), ARML(Acrossomo Reagido e membrana plasmática Lessada), ARMI (Acrossomo Reagido e Membrana Plasmática Íntegra) expressos em porcentagem (%), de espermatozoides suínos refrigerados por 72 h.....	53
Tabela 4 -	Média \pm erro padrão da população de células MI (Membrana Plasmática Íntegra) e AI(Acrossomo Íntegro) expressos em porcentagem (%), de espermatozoides suínos refrigerados por 72 h avaliados por citometria de fluxo	53
Tabela 5 -	Média \pm erro padrão da população de células AIML (Acrossomo Íntegro e Membrana Plasmática Lesada) ARML(Acrossomo Reagido e Membrana Plasmática Lesada) e ARPI (Acrossomo Reagido e Membrana Plasmática Íntegra), expressos em porcentagem (%), de espermatozoides suínos refrigerados avaliados por citometria de fluxo no período de 72 h.....	54
Tabela 6 -	Média \pm erro padrão da peroxidação lipídica, medida em intensidade de fluorescência (a.ºu.), de espermatozoides suínos refrigerados avaliados pela citometria de fluxo no período de 72 h	55
Tabela 7 -	Média \pm erro padrão da desordem lipídica, expressa em intensidade de fluorescência média (a. u.) de espermatozoides suínos refrigerados, avaliados por citometria de fluxo no período de 72 h.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	microlitro
μm	micrômetro
AI	membrana acrossomal íntegra
AIMI	acrossomo íntegro, membrana plasmática íntegra
AIML	acrossomo íntegro, membrana plasmática lesada
ALH	amplitude lateral da cabeça
AMPc	adenosina monofosfato cíclic
ARML	acrossomo reagido, membrana plasmática lesada
ARMI	acrossomo reagido, membrana plasmática íntegra
BCF	frequência batimento flagelar
CASA	<i>Computer Assited Sperm Analisys</i>
g	força centrífuga
H33342	Hoescht 33342
HIPER	hiperativação
Hz	Hertz
Kg	quilogramas
LIN	linearidade
mg	miligramas
mL	mililitro
MI	membrana plasmática íntegra
MP	motilidade progressiva
MT	motilidde total
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	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM SUÍNOS E UTILIZAÇÃO DE SÊMEN REFRIGERADO	22
2.2	PLASMA SEMINAL	23
2.3	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	25
2.4	CAPACITAÇÃO E HIPERATIVAÇÃO DAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS	26
3	HIPÓTESES	29
4	OBJETIVOS	31
5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	33
6	MATERIAL E MÉTODO	35
6.1	LOCAL E PERÍODO EXPERIMENTAL.....	35
6.2	ANIMAIS	36
6.3	COLETA E ANÁLISE DE SÊMEN PRÉ-DILUIÇÃO	37
6.3.1	Concentração espermática	38
6.3.2	Avaliação das características morfológicas	39
6.4	DISTRIBUIÇÃO DOS TRATAMENTOS	40
6.5	AVALIAÇÃO COMPUTADORIZADA DAS CARACTERÍSTICAS DO MOVIMENTO ESPERMÁTICO.....	40
6.6	ANÁLISES POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	42
6.6.1	Avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal por citometria de fluxo	42
6.6.2	Avaliação da peroxidação das membranas espermáticas por citometria de fluxo	44
6.6.3	Avaliação da estabilidade (fluidez) da membrana plasmática por citometria de fluxo	46
6.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
7	RESULTADOS	50

7.1	EFEITO DO PLASMA SEMINAL SOBRE AS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DO ESPERMATOZOIDE SUÍNO REFRIGERADO	50
7.1.1	Efeito do plasma sêminal sobre a cinética do espermatozoide suíno	50
7.1.2	Efeito do plasma sêminal sobre a integridade das membranas plasmática e acrossomal	51
7.1.3	Efeito do plasma seminal sobre a peroxidação lipídica da membranas espermáticas	55
7.1.4	Efeito do plasma seminal na manutenção da estabilidade (fluidez) da membrana plasmática	55
8	DISCUSSÃO	58
9	CONCLUSÕES.....	62
	REFERÊNCIAS.....	64
	ANEXOS.....	69

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) vêm sendo utilizada de forma crescente na produção de suínos e hoje, é inquestionável a importância desta biotecnica como ferramenta no aumento da eficiência reprodutiva na suinocultura moderna (JOHNSON et al., 2000; GADEA, 2003; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2005;).

A técnica da IA, quando comparada à monta natural, traz inúmeras vantagens, uma delas, se não a mais importante, é a introdução de genes reconhecidamente superiores ao rebanho, com risco mínimo de transmissão de doenças (MAES et al., 2008).

O sêmen suíno refrigerado é, até os dias atuais, utilizado de forma majoritária em mais de 90% de todas IA's registradas em todo o mundo (WAGNER et al., 2000), em contrapartida, o sêmen congelado ainda participa de forma minoritaria de todas as IA's realizadas (WHITE et al., 2000). Uma das razões pelas quais o sêmen refrigerado é tão amplamente utilizado deve-se em parte a possibilidade de armazenamento por períodos relativamente longos a 15-17°C, quando este é acrescido a diluentes especiais (GERRITS et al., 2005). Outro motivo diz respeito à alta sensibilidade dos espermatozoides suínos ao processo de criopreservação, possivelmente pela baixa proporção colesterol/fosfolípido em sua membrana plasmática e, por isso, a viabilidade das células espermática fica comprometida em decorrência de danos estruturais que são gerados pela técnica (WHITE, 1993; WATSON, 1996).

No entanto, a manutenção da viabilidade espermática do sêmen refrigerado e armazenado por períodos prolongados, ainda é um dos grandes desafios enfrentados nos programas de inseminação artificial na produção de suínos (DUBÈ et al., 2004). Ocorre que, a fertilidade das doses de sêmen diluído e refrigerado diminui à medida que o tempo de armazenamento aumenta. Nesse sentido, para atender a crescente exigência da indústria suinícola, por períodos maiores de conservação das doses de sêmen, hoje já existem disponíveis no mercado diferentes tipos de diluentes. Estes produtos são responsáveis por suprir os nutrientes necessários para a manutenção do metabolismo dos espermatozoides, pelo controle do pH, pelo controle da pressão osmótica do meio e por inibir o crescimento bacteriano (GADEA, 2003; DUBÈ et al., 2004).

Um grande volume de sêmen é ejaculado pelo macho da espécie suína, o volume total pode ultrapassar 200 mL. O ejaculado suíno é composto por uma série de frações comumente

denominadas de pré-espermática (fração composta por secreções das glândulas bulbouretrais e também da próstata), fração rica (fração que possui a maior concentração de espermatozoides) e fração pobre (quantidade reduzida de células espermáticas). Por sua vez, os espermatozoides são encontrados em maior concentração nos primeiros pulsos ejaculatórios da fração rica (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2005).

Duas partes distintas compõem o sêmen, uma parte celular representada pelos espermatozoides, que correspondem a 1% de seu volume total e outra acelular, genericamente chamada de plasma seminal. O plasma seminal é resultante da mistura de diferentes secreções produzidas por estruturas do trato reprodutivo do macho tais como: testículos, epidídimo e glândulas sexuais acessórias. Este produto secretório desempenha importante papel, não somente sobre o metabolismo espermático, mas também no processo de fecundação. Vários componentes orgânicos e inorgânicos constituem o plasma seminal como aminoácidos, proteínas, íons, frutose, sorbitol, inositol, bicarbonato, substâncias antimicrobianas, lipídios e uma gama variada de substâncias hormonais (JUYENA; STELLETA, 2012).

Alguns componentes do plasma seminal, apesar de sua aparente simplicidade, desempenham importantes papéis na viabilidade dos espermatozoides, por exemplo, o bicarbonato modula a motilidade dos espermatozoides e desestabiliza a membrana plasmática durante o processo de capacitação espermática (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2001), já o zinco está envolvido na estabilização da cromatina (BJÖRNDAHL; KVIST, 2010). Proteínas e peptídeos que perfazem de 30-60 g/L do plasma seminal de suínos, desempenham uma miríade de outras funções (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

As proteínas do plasma seminal estão envolvidas em várias etapas que precedem a fertilização tais como regulação da capacitação espermática, estabelecimento do reservatório espermático no oviduto, modulação da resposta imune uterina, transporte espermático através do trato reprodutivo feminino e interação dos gametas (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

No ejaculado suíno, a concentração de proteínas é baixa na fração pré-espermática e é encontrada em alta concentração no início da fração rica. Ainda no início da fração rica, onde também se encontra o maior número de espermatozoides, há proteínas traduzidas por expressão gênica no epidídimo, como lipocalinas e inibidores da acrosina e tripsina que estão envolvidas nos eventos relacionados a fecundação (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2009).

Durante a coleta de sêmen, os espermatozoides são submetidos a uma situação diversa do que ocorre naturalmente durante a cobertura. As células espermáticas *in vitro* são expostas

a todas as secreções das glândulas anexas de uma só vez. *In vivo* as células espermáticas não são necessariamente expostas a todas as secreções que constituem o plasma seminal, já que essas são liberadas em pulsos ejaculatórios e, assim, os espermatozoides são banhados por diferentes concentrações de constituintes do plasma seminal, incluindo peptídeos e proteínas (SARAVIA et al., 2009; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

Talvez essa seja a explicação pela qual apesar de todos os benefícios que o plasma seminal desempenha *in vivo*, estudos mostram que este não é o melhor meio para a conservação de espermatozoides. Por exemplo, em equinos, uma grande proporção de plasma seminal presente no sêmen refrigerado leva a uma redução da motilidade espermática e quando em quantidade reduzida, a sobrevida dos espermatozoides é estendida (VARNER, 1992; SQUIRES et al., 1999).

Em bovinos, foram encontradas proteínas ligadoras a fosfolipídios presentes no plasma seminal, proteínas denominadas BSP. Essas macromoléculas apesar de estarem envolvidas no processo de fertilização causam danos aos espermatozoides armazenados, pois promovem o efluxo de lipídios da membrana plasmática e ao longo do tempo causam remoção contínua do colesterol da membrana, o que deixa os espermatozoides vulneráveis durante sua preservação. Em garanhões, foram identificadas proteínas (HSP-1, HSP2 E HSP-12) presentes no plasma seminal que são deletérias a sobrevida dos espermatozoides sob refrigeração (BERGERON; MAJUNATAH, 2006). Em suínos, algumas proteínas integrantes da família das espermadesinas podem ser danosas a viabilidade dos espermatozoides já que são responsáveis pelo processo de capacitação espermática e assim tornam os espermatozoides capacitados antes do momento ideal (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

Diante do exposto, e com base na literatura citada o presente trabalho pretendeu verificar a influência do plasma seminal, oriundo da fração rica do ejaculado, sobre a viabilidade e a cinética do sêmen suíno refrigerado a 17°C por 72 horas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A capacidade fecundante do sêmen diluído refrigerado diminui a medida que se estende o período de armazenamento. No decorrer desse período, o espermatozoide suíno passa por uma série de alterações prejudiciais, dentre estas pode-se citar a diminuição da motilidade, alterações de permeabilidade da membrana plasmática e danos estruturais e funcionais causados pelo processo de peroxidação lipídica (CEROLINE et al., 2001). A seguir serão abordados, com mais detalhes algumas destas modificações.

2.1 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM SUÍNOS E UTILIZAÇÃO DE SÊMEN REFRIGERADO

A inseminação artificial (IA) na suinocultura teve seu início nos primórdios do século passado quando foi primeiramente realizada por Ivanow na Rússia em 1926. A partir da década de trinta, a técnica da IA passou por um processo de desenvolvimento quando foi aplicada em fazendas estatais Russas e ao longo de anos subsequentes houve a transferência dessa biotecnica para outros países (JOHNSON et al., 2000; GDEA, 2003). No entanto, foi somente a partir dos anos oitenta que a IA sofreu aprimoramento e passou a ser então utilizada amplamente de forma comercial (CRABO, 1990; JOHNSON et al., 2000).

Na atualidade a IA é amplamente utilizada em todos os países onde a suinocultura é tecnificada. Estima-se que mais de 19 milhões de inseminações sejam realizadas mundialmente todos os anos, no mesmo dia da coleta ou após armazenamento em estado líquido, por períodos de 1 a 5 dias em temperaturas que variam de 15 a 20°C (JOHNSON et al., 2000; WAGNER et al., 2000).

A IA é a grande ferramenta do melhoramento animal, pois por intermédio do seu uso torna-se possível a transferência de genes dos melhores reprodutores suínos para um grande número de matrizes promovendo o melhoramento do rebanho (GDEA, 2003); também permite que seja realizada um controle prévio de qualidade das doses inseminantes, uma vez que, ejaculados que não atendão os parametros especificados de qualidade podem então ser despresados (BAILEY et al., 2008).

Uma grande vantagem da utilização do sêmen suíno refrigerado diluído é a manutenção da fertilidade mesmo com baixo número de espermatozoides por dose, de fato, quanto menor o número de espermatozoides por dose e quanto mais curto o período de estocagem maior a viabilidade das doses inseminantes produzida a partir de um ejaculado. Não obstante, a manutenção prolongada da capacidade fecundante dos espermatozoides mantidos sob refrigeração é ainda uma grande meta a ser alcançada pela indústria suinícola (DE AMBROGI et al., 2006).

O espermatozoide suíno é particularmente sensível ao choque frio, dessa forma, a manutenção das doses de sêmen já diluídas, em temperaturas acima de 15°C, durante algumas horas, se faz imprescindível no aumento da resistência das células espermáticas ao choque frio (PURSEL et al., 1973). Acredita-se que a suscetibilidade do espermatozoide suíno ao choque frio tenha relação com a composição lipídica de sua membrana plasmática o que afeta a sua fluidez já que a medida que a temperatura diminui os fosfolipídios sofrem restrição de movimento lateral o que faz com que a membrana mude de fluida para a fase de gel (WATSON, 1996). Outro fator de sensibilidade diz respeito à percentagem de colesterol presente na membrana plasmática já que na célula espermática dos suínos a proporção colesterol/fosfolipídios é muito baixa e, como o colesterol é distribuído de maneira assimétrica, este se encontra em maior proporção na porção externa da monocamada lipídica. Essa combinação torna a porção interna da monocamada particularmente vulnerável ao choque frio. A reorganização das partículas integrantes da membrana plasmática, mesmo que parcialmente reversíveis, pode influenciar a sua funcionalidade de várias formas tais como: promovendo o aumento da permeabilidade, resultando no extravasamento de cátions, íons e enzimas, na interferência de atividades enzimáticas e alterações em canais iônicos (DE LEEUW et al., 1990).

2.2 PLASMA SEMINAL

O plasma seminal é o produto secretório de diferentes estruturas do trato reprodutivo masculino como: rede testis, epidídimo e das glândulas sexuais acessórias e, desta forma, apresenta uma composição química variada (TROEDSSON, 2005; JUYENA; STELLETA, 2011). Apesar do não conhecimento da natureza de todos os seus componentes, sabe-se que

alguns desses são importantes no desenvolvimento e maturação espermática ainda no ambiente testicular. Também há evidências que o plasma seminal desempenhe papel ativo no trato reprodutivo da fêmea através da ação de vários hormônios e enzimas, proteínas, lipídios e metabolitos que o compõe. Ainda com relação à fêmea, o plasma seminal melhora o transporte dos espermatozoides ao oviduto, influencia o momento da ovulação, aumenta o fluxo sanguíneo uterino e modula a resposta imune uterina (WEITZ et al., 1990; KIRKWOOD et al., 2008; MADEJ et al., 2012).

No plasma seminal suíno pode ser encontrada uma grande variedade de proteínas que exercem efeitos variados. Composto esse quadro, há um grupo de proteínas de baixo peso molecular (12-16 kDA) denominadas genericamente de espermedesinas que correspondem a 90% de todas as proteínas do plasma seminal suíno. Essa família de proteínas é composta por cinco membros: AQN-1, AQN-3, AWN, PSP-I, e PSP-II. As espermedesinas possuem ações biológicas variadas incluindo ligação a membrana dos espermatozoides no momento da ejaculação resultando em mudanças estruturais que estão relacionadas com a capacitação espermática, também estão envolvidas no processo de fertilização (CALVET et al., 1995; TÖPFER-PETERSEN; CALVETE, 1996; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2005; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

Em estudo realizado por Saravia et al. (2009) foi levantada a possibilidade do plasma seminal influenciar motilidade do espermatozoide suíno, bem como a sua resistência ao choque frio e ao estresse oxidativo. Um grande número de enzimas podem ser encontradas no plasma seminal e a maioria delas possuem ação antioxidante, protegendo os lipídios da membrana plasmática contra danos peroxidativos causados pelas espécies reativas de oxigênio (LEWIS et al., 1997; BALL et al., 2000). Várias substâncias desempenham função antioxidante, protegendo a célula espermática contra os efeitos nocivos das espécies reativas de oxigênio, dentre estas podemos citar as enzimas com funções antioxidantes catalase, superóxido-dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPX) e glutatona redutase (GRD) (SANOCKA et al., 1996; KOZIOROWSKA-GILUN et al., 2010).

Como já mencionado, a coleta de sêmen representa uma situação não fisiológica, já que os espermatozoides são expostos a todos os constituintes do plasma seminal ao mesmo momento e, desta forma, o plasma seminal deixa de exercer uma ação benéfica e passa a ser deletério ao processo de conservação do sêmen (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011). Algumas alternativas podem ser utilizadas na tentativa de se reduzir os efeitos nocivos do plasma seminal tais como: utilizar o método da colheita fracionada, onde somente a fração

rica do sêmen é coletada, alta diluição das doses inseminantes ou ainda através do emprego da centrifugação (JASKO et al., 1991; SQUIRES, 1999). No entanto, em equinos, onde o processo de centrifugação é muito utilizado para retirada do plasma seminal, previamente a refrigeração ou congelamento, a técnica pode resultar em perda de células espermáticas e danos à motilidade (VIDAMENT et al., 2000).

2.3 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

As células dos mamíferos sob condições aeróbicas produzem espécies reativas de oxigênio (ROs) como resultado do seu metabolismo normal. Os espermatozoides não fogem a regra e são capazes de produzir ânions superóxidos (O_2^-) que por sua vez, através de ação enzimática ou de forma espontânea, sofre desmutação e da origem ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Os ânions superóxidos (O_2^-), em razão da sua reduzida meia vida, não causam grandes prejuízos a economia celular, no entanto, o peróxido de hidrogênio após sofrer catalização, em presença de íons ferro, da origem aos radicais hidroxila (OH^\cdot) que são extremamente reativos possuindo como substrato preferencial os ácidos graxos poliinsaturados e o colesterol (BROUWERS et al., 2005). Na membrana plasmática do espermatozoide suíno há uma grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados e de colesterol que o tornam muito suscetível a peroxidação lipídica durante a sua estocagem sob refrigeração (CEROLINI et al., 2001; FLESCHE et al., 2001; KUMARESAN et al., 2009).

A peroxidação lipídica é desencadeada quando as espécies reativas de oxigênio (ROs) interagem com os ácidos decosaheptanoicos presentes na membrana plasmática do espermatozoide, quando isso ocorre, uma molécula de hidrogênio é retirada de uma dupla ligação e, assim, esse passa a ser um radical livre, que por sua vez reage com outro ácido decosaheptanoico e assim por diante. A cascata de peroxidação é então iniciada o que resultará em prejuízos a estrutura da membrana plasmática que então perde a sua fluidez e a capacidade regulatória da concentração intracelular de íons que participam do controle do movimento espermático, também há alterações no metabolismo celular o que leva a redução da capacidade fecundante dos espermatozoides e ao DNA nuclear (AITKEN; KRAUSZ, 2001).

2.4 CAPACITAÇÃO E HIPERATIVAÇÃO DAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS

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 já que as células espermáticas recém ejaculadas não estão aptas a executarem este processo (HARRISSON, 1996).

A capacitação é uma via bioquímica à qual o espermatozoide deve passar para estar apto a fertilizar o oócito; estas envolvem: mudanças na composição lipídica das membranas espermáticas, produção de espécies reativas de oxigênio, migração das proteínas de membrana, exteriorização de receptores de membrana, ativação de canais iônicos, ativação intracelular de cAMP e fosforilação e desfosforilação de aminoácido (AITKEN et al., 1995; VISCONTI et al., 1995; VISCONTI; KOPF, 1998).

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 capacitor 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).

O processo de capacitação espermática também envolve mudanças no padrão de motilidade, o qual é denominado de hiperativação (YANAGIMACHI, 1994). Este padrão de movimento é necessário para a progressão do espermatozóide na tuba uterina, permitindo a liberação do espermatozóide do epitélio do istmo (DEMOTT; SUAREZ, 1992) e promovendo a motilidade necessária para a penetração da zona pelúcida (SUAREZ; PACEY, 2006). A hiperativação é caracterizada por movimentos vigorosos do flagelo, marcante deslocamento lateral da cabeça do espermatozóide e presença de uma trajetória não progressiva (SUAREZ;

KATZ; OVERSTREET, 1983). No entanto a hiperativação deve ter seu início em lugar e momento apropriado para que o espermatozóide consiga realizar a fertilização.

A hiperativação tem sido considerada como parte no processo de capacitação; entretanto, há evidências (em bovinos) que a hiperativação é regulada separadamente ou por uma via de sinalização do Ca^{2+} divergente da que regula a reação acrossomal, tendo em vista, que a hiperativação ocorre mesmo quando é adicionado ao meio substâncias que bloqueiam a capacitação como o H-89, um inibidor da proteína quinase A (PKA) e o Rp-cAMPS, antagonista do cAMP (MARQUEZ; SUAREZ, 2004).

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).

HIPÓTESES

3 HIPÓTESES

- A retirada do plasma seminal oriundo da fração rica do ejaculado melhora as características da motilidade dos espermatozoides suínos armazenados à 17°C por 72 horas.
- A retirada do plasma seminal oriundo da fração rica do ejaculado diminui a lesão nas membranas plasmática e acrossomal dos espermatozoides suínos armazenados à 17°C por 72 horas.
- A retirada do plasma seminal oriundo da fração rica do ejaculado altera a peroxidação lipídica do sêmen suíno refrigerado a 17°C por 72 hs.
- A retirada do plasma seminal oriundo da fração rica do ejaculado altera a manutenção da estabilidade (fluidez) da membrana plasmática.

OBJETIVOS

4 OBJETIVOS

Avaliar os efeitos do plasma seminal oriundo da fração rica do ejaculado sobre os espermatozoide suíno armazenado sob refrigeração a 17°C por 72 horas com relação as seguintes variáveis:

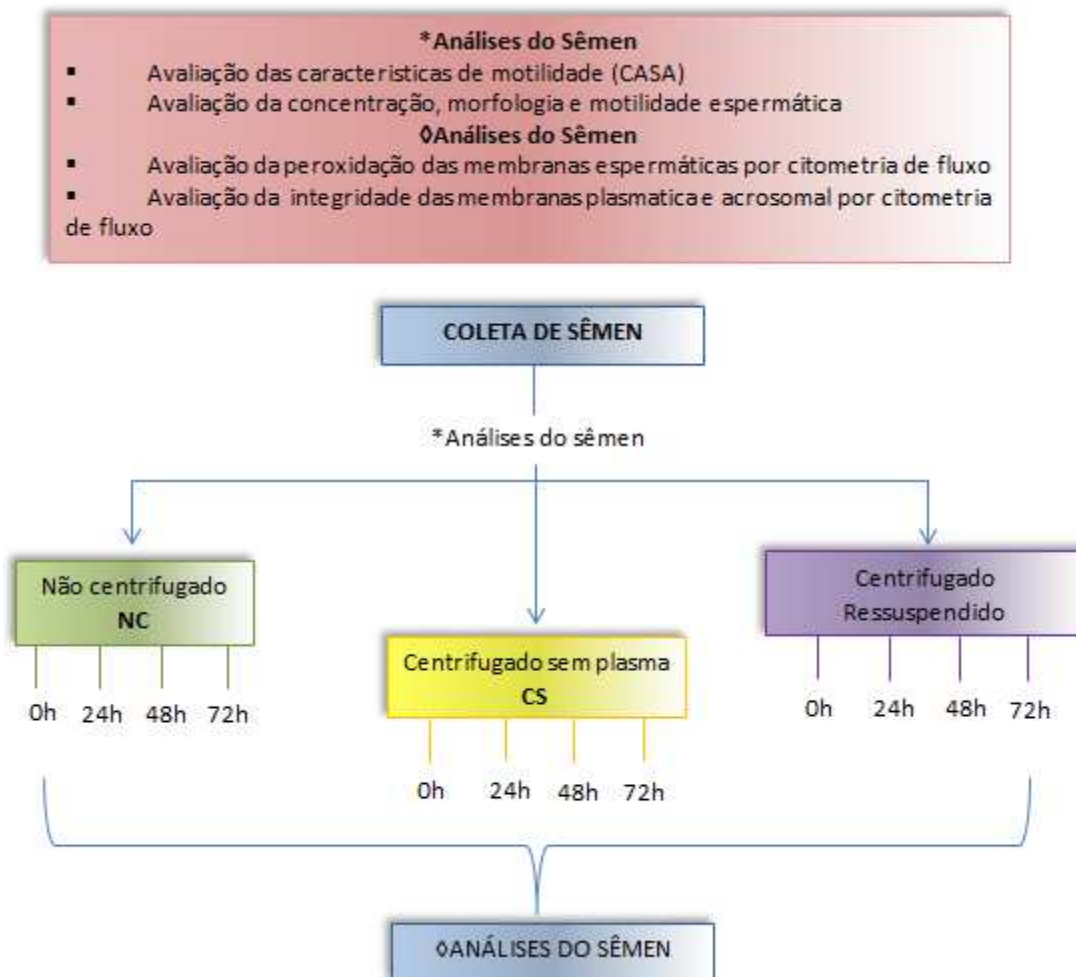
- cinética espermática
- Integridade das membranas plasmática e acrossomal
- Peroxidação lipídica das membranas
- Manutenção da estabilidade (fluidez) da membrana plasmática

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este estudo foi delineado em blocos generalizados, onde cada cachão foi considerado um bloco. Sendo 1/3 do ejaculado considerado como a unidade experimental.

Figura 1 - Esquema experimental das análises realizadas



Fonte: (LEAL, D. F., 2015)

MATERIAL E MÉTODO

6 MATERIAL E MÉTODO

Nesta sessão encontram-se descritas as metodologias empregadas no presente experimento.

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 novembro de 2015 a Dezembro de 2015.

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



Fonte: (LEAL, D. F., 2015)

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



Fonte: (LEAL, D. F., 2015)

6.2 ANIMAIS

Foram utilizados seis cachaaos híbridos (Landrace x Largewhite). Os animais foram submetidos à manejo nutricional e sanitário idênticos e alojados nas dependências do NPS-FMVZ/USP. Os animais foram alojados em baias individuais com metragem de 9,76 m²/animal, providas de comedouro e bebedouros tipo chupeta. Durante o período experimental os animais receberam uma dieta basal seguindo recomendações do NRC (1998). O consumo estabelecido foi estipulado de acordo com o peso do animal, variando de 2,4 a 3,1 kg/animal/dia (3,15 Mcal/EM/Kg; 16% PB; 0,85% lisina; 0,75% Ca; 0,65% P - raação Reprodutor Avant[®], Agroceres Multimix). O arraaoamento era realizado duas vezes ao dia, 7:00 e 13:00 horas.

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



Fonte: (LEAL, D. F., 2015)

6.3 COLETA E ANÁLISE DE SÊMEN PRÉ-DILUIÇÃO

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 a concentração (com o auxílio de um hematocítmetro), 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 80 %, alterações morfológicas abaixo de 20% e concentração espermática $\geq 800 \times 10^6$ por ml foram submetidos à diluição.

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

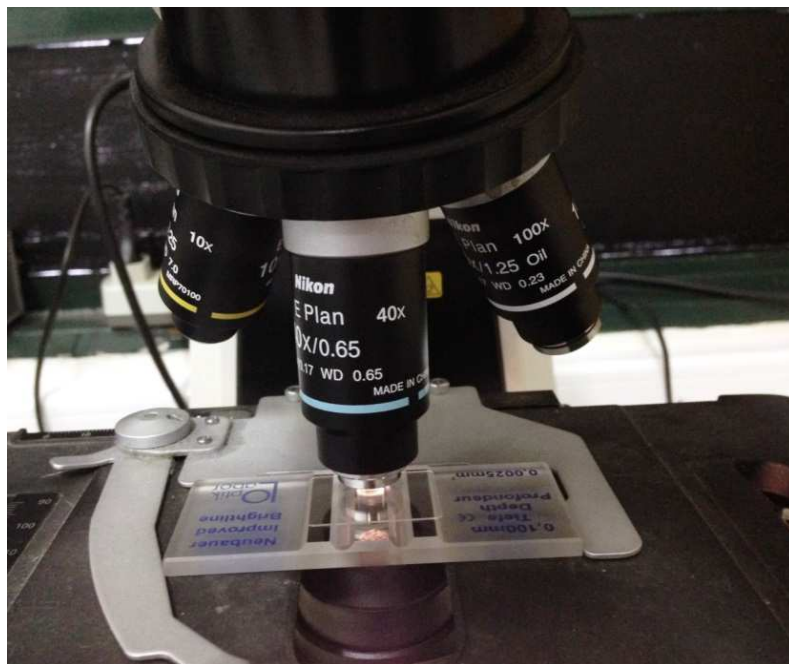


Fonte: (LEAL, D. F., 2015)

6.3.1 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 (Laboroptic, Lancing, United Kingdom), aumento de 400 $^{\circ}$ x (Figura 6).

Figura 6 - Contagem espermática por meio da utilização da câmara de Neubauer, aumento de 400x



Fonte: (LEAL, D. F., 2015)

6.3.2 Avaliação das características morfológicas

As avaliações das características morfológicas dos espermatozoides foram realizadas pela técnica da câmara úmida. Para tanto, 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).

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

6.4 DISTRIBUIÇÃO DOS TRATAMENTOS

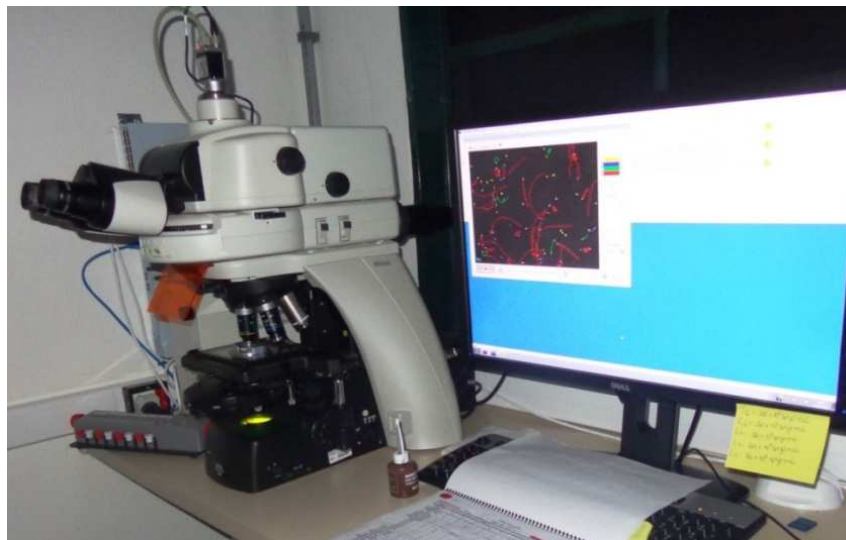
Após a primeira avaliação os ejaculados foram acondicionados em tubos cônicos de 50 mL para serem divididos em três tratamentos, a saber: não centrifugado (NC), centrifugado e com o plasma seminal retirado pós-centrifugação (CS) e centrifugado resuspendido (CR). A força de centrifugação utilizada foi de 500xg por 10 minutos.

Todos os tratamentos foram submetidos à diluição em meio BTS (Beltisville Thawing Solution, IMV Technologies, L'Aigle, França) calculando-se uma concentração de 30×10^6 espermatozoides por mililitro (mL) para que fosse obtido um volume final da DI. Em seguida, as amostras permaneceram por 90 minutos em temperatura ambiente e protegidas da luz antes de serem transferidas para o refrigerador. As doses com os diferentes tratamentos foram acondicionadas à temperatura de 17°C e avaliadas nos intervalos 0 (90 min pós-diluição), 24, 48 e 72 horas para os seguintes parâmetros: características da motilidade, integridade das membranas plasmática e acrossomal, e peroxidação das membranas espermáticas.

6.5 AVALIAÇÃO COMPUTADORIZADA DAS CARACTERÍSTICAS DO MOVIMENTO ESPERMÁTICO

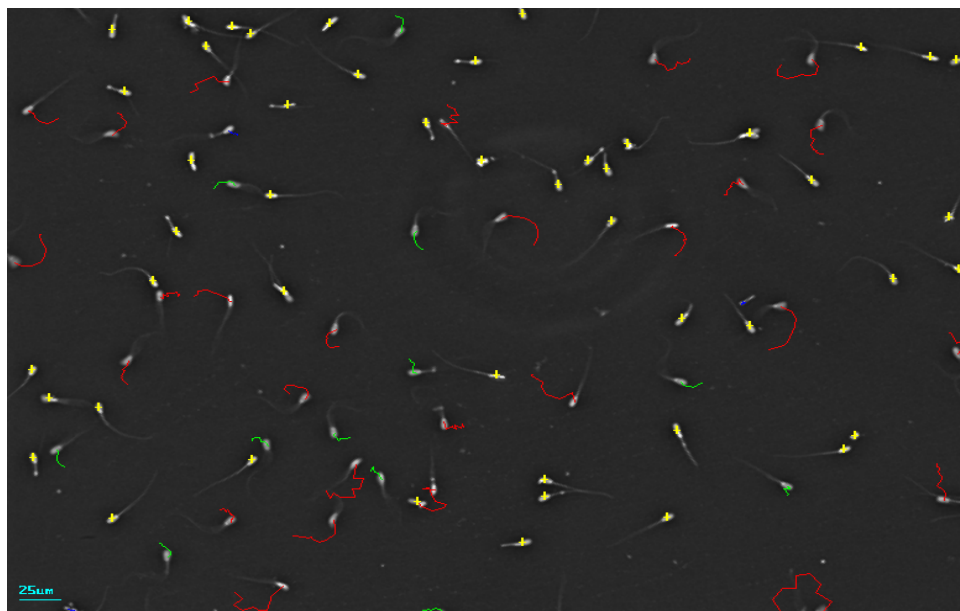
A motilidade espermática foi avaliada por meio do *software* Sperm Class Analyser (SCA –Microoptics Barcelona, Espanha), acoplado a um microscópio equipado com contraste de fase (Nikon, Modelo Eclipse Ni-U 80i) (Figura 7 e 8) com sêmen diluído em meio TALP *sperm* (Anexo A) (30×10^6 espermatozoides/mL). 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, %).

Figura 7 - Sistema de análise computadorizada do sêmen (SCA®, Microptic S.L., Barcelona, Espanha) instalado em um computador com camera acoplada a um microscópio de epifluorescência (Nikon®, Modelo Eclipse NI-U) para captura de imagens



Fonte: indicar a fonte da figura

Figura 8 - Imagem gerada pelo programa de análise computadorizada do sêmen pelo programa Sperm Class Analyzer (SCA®, Microptics S. L., Barcelona, Espanha)



Fonte: (LEAL, D. F., 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.

6.6 ANÁLISES POR CITOMETRIA DE FLUXO

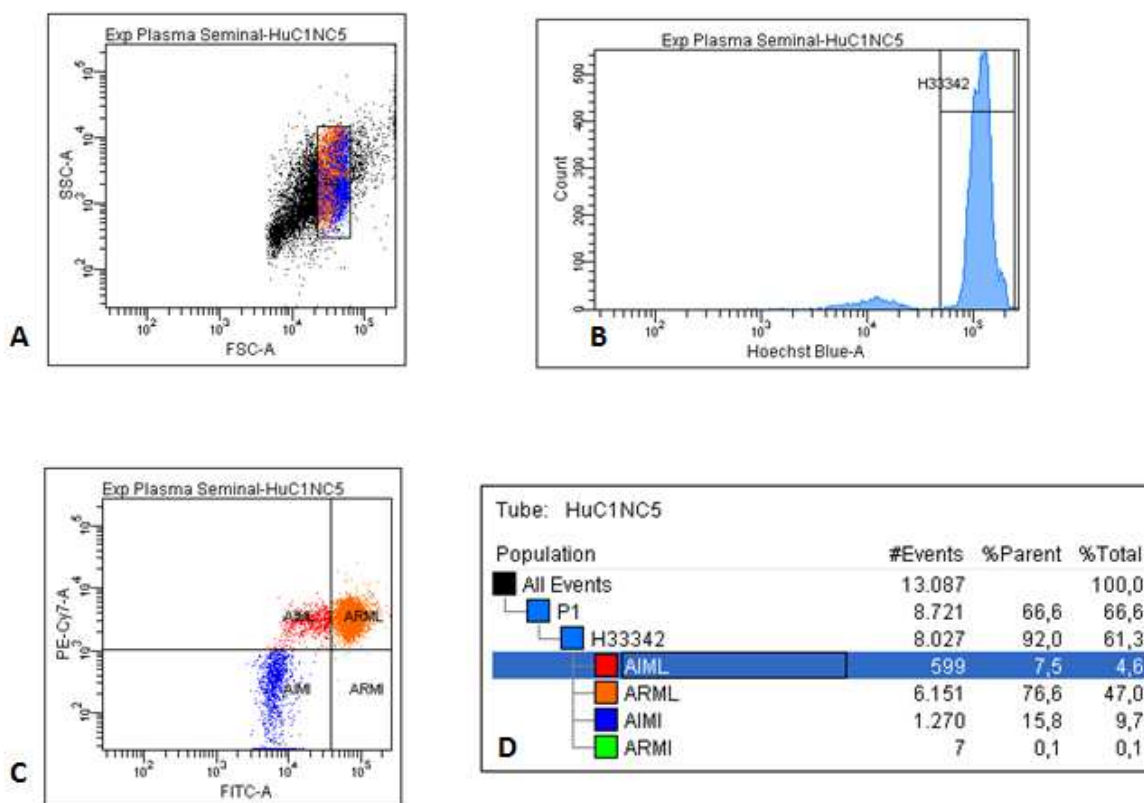
As amostras para coloração e análise em citometria de fluxo foram diluídas em meio modificado de Tyrode's (TALPm) contendo 114 mM de NaCl, 3,2 mM de KCl, 0,5 mM de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,4 mM de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 5 mM de glicose, 10 mM de lactato de sódio, 0,1 mM de piruvato de sódio, 10000 UI/100 mL de penicilina sódica. O pH do meio foi corrigido até 7,4 com o uso de NaOH 1 N. Após a adição das sondas fluorescentes indicadas para as análises (itens 3.7 e 3.8), as amostras de sêmen incubadas em TALPm foram analisadas no citometro de fluxo BD FACSAria (Beckton-Dickeson, San Jose, USA) controlado pelo *software* BDFACSDiva 6.0 (Beckton-Dickeson, San Jose, USA). As amostras foram passadas no instrumento com uma taxa de aquisição de aproximadamente 600-1000 eventos/s, sendo adquiridos 10000 células por análise. As células foram excitadas ao mesmo tempo por um laser de argônio na faixa de 488 nm e por um laser Near UV na faixa de 375 nm.

6.6.1 Avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal por citometria de fluxo

As alíquotas retiradas das amostras foram adicionadas ao TALP *sperm* modificado (TALPm) em tubos de microcentrifugação (1,5 mL) pré-aquecidos a 37°C, a fim de se obter amostras com concentração de 5×10^6 espermatozóides por mL. A seguir, foi adicionada 2 µL a sonda Hoechst 3342 (40 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 houvesse a contagem de forma equivocada de partículas com o mesmo tamanho e granulosidade do espermatozóide (DE ANDRADE et al., 2011). Passado o período de incubação, foram adicionados a amostra 3 µL de Iodeto de Propídio (IP-0,5 mg/mL, L0770, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA), conjuntamente com a adição de 10 µL de aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA-100 µg/mL, L-0770, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA) estas sondas tiveram os seguintes objetivos; corar as células com membrana plasmática lesada (IP positivo) (CELEGHINI et al., 2007; DE ANDRADE et al.,

2007) e com a membrana acrossomal lesada (FITC-PSA positivo) (ANDRADE et al., 2006; DE ANDRADE et al., 2011). Após 10 minutos de incubação a 37°C, os espermatozoides foram diluídos com a adição de 150 µL de TALPm 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 9)

Figura 9 - Gráficos gerados a partir do software FACSDiva 6.1, das análises de integridade de membranas plasmática e acrossomal



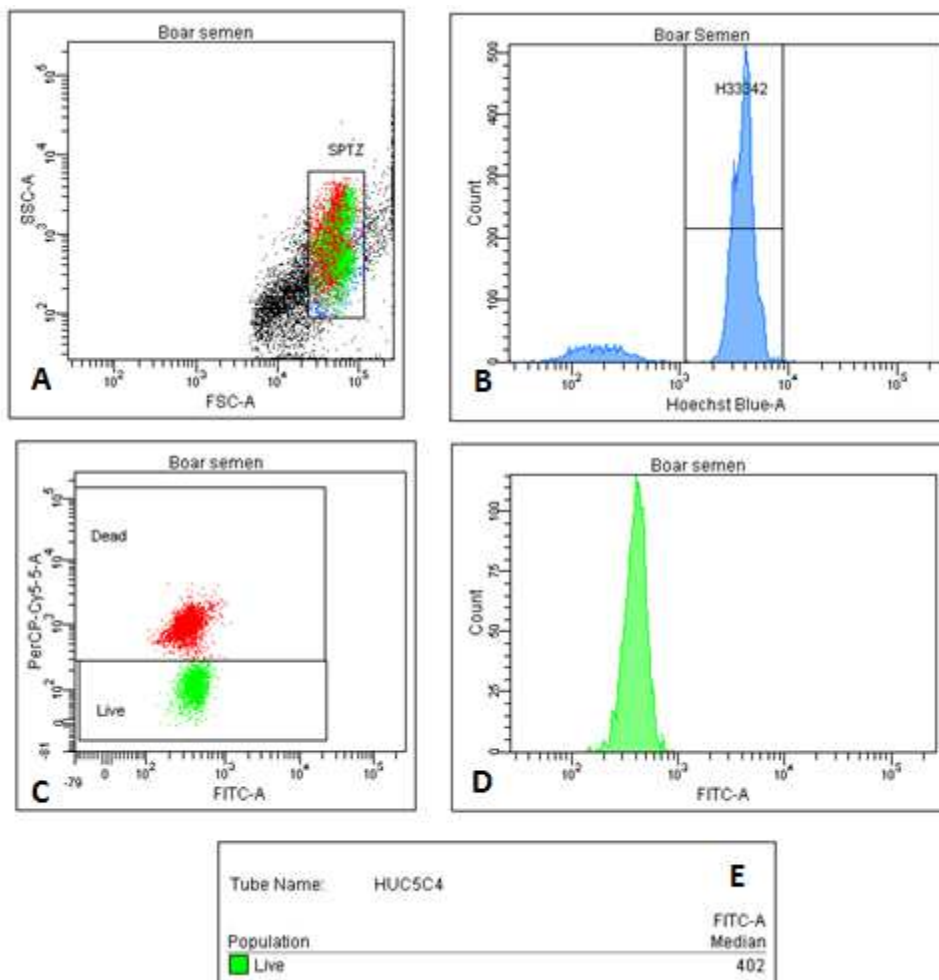
Fonte: (LEAL, D. F., 2015)

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) Gráfico de pontos gerado pela análise de 10.000 células por citometria de fluxo. D) Quadro com a percentagem das quatro categorias de células.

6.6.2 Avaliação da peroxidação das membranas espermáticas por citometria de fluxo

Para esta finalidade, foram retiradas alíquotas de sêmen durante as etapas de análise a fim de se obter amostras diluídas em TALPm com 5×10^6 espermatozoides/mL. Estas foram então coradas com 0,5 μ L da sonda C11-BODIPY^{581/591} (1 mg/mL, D-3861, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) por 30 minutos a 37°C. Após a finalização do período de incubação, as amostras foram transferidas para outros microtubos 145 μ L destas soluções, agora, coradas com a sonda C11-BODIPY^{581/591}. A estas amostras foram adicionados 2 μ L de Hoechst 33342 com posterior incubação por 10 minutos a 37°C. Logo após, foram adicionadas as amostras 3 μ L de Iodeto de Propídio. 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 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 por citometria de fluxo (DE ANDRADE et al., 2012; MARTINS et al., 2014) (Figura 10). 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 10 - Gráficos gerados a partir do software FACSDiva 6.1, da sonda de peroxidação lipídica pela espermática na citometria de fluxo



Fonte: (LEAL, D. F., 2015)

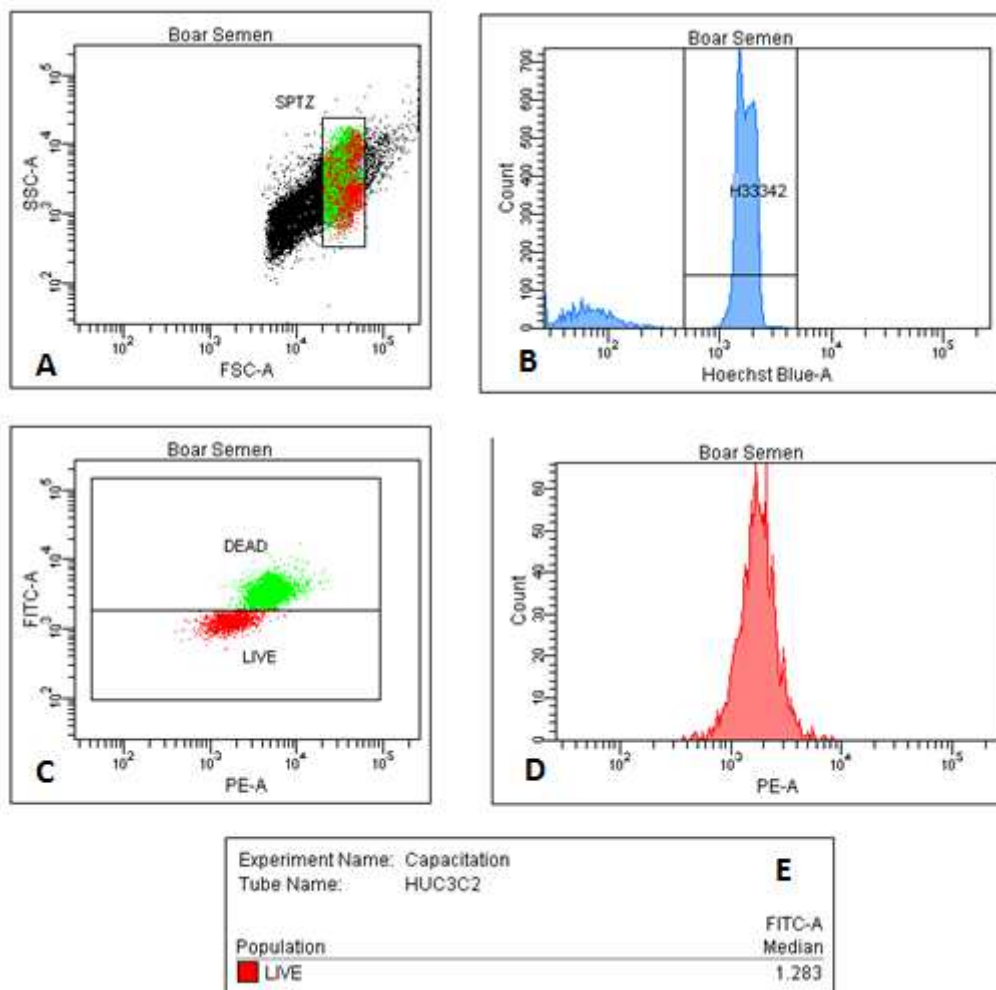
Legenda: A) Pré-seleção espermática pelo tamanho e complexidade interna das células. B) Seleção da população Hoescht 33342 (H33342) positiva a partir da população pré-selecionada no gráfico A. C) *Dotplot* com a separação das células positivas (mortas) e negativas (vivas) para Iodeto de Propídio. D) 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}.

6.6.3 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 (FLESCH 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 μ L. Foram então 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. Em seguida 0,5 μ L da sonda fluorescente Yo-Pro-1 (7,5 μ M-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 μ L da sonda fluorescente Merocianina 540 (810 μ M-MolecularProbes Inc., Eugene, Oregon, EUA) a fim de se obter uma concentração de 2,7 μ M em uma solução final de 150 μ L, em seguida estas foram incubadas por 70 segundos. Foram então diluídas em 150 μ L de TALPm e analisadas por citometria de fluxo (Figura 11), 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 11 - Gráficos gerados a partir do software FACSDiva 6.1, da sonda Merocianina na citometria de fluxo



Fonte: (LEAL, D. F., 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.

6.7 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. Os tratamentos foram avaliados pelo teste de médias Tukey-kramer 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).

RESULTADOS

7 RESULTADOS

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

7.1 EFEITO DO PLASMA SEMINAL SOBRE AS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DO ESPERMATOZOIDE SUÍNO REFRIGERADO

Neste tópico serão apresentados os resultados do efeito do plasma seminal sobre o movimento espermático; na integridade das membranas acrossomal e plasmática; na peroxidação lipídica, na manutenção da estabilidade (capacitação da membrana plasmática e nas características morfológicas do espermatozoide suíno refrigerado.

7.1.1 Efeito do plasma sêminal sobre a cinética do espermatozoide suíno

Os resultados das características da movimentação espermática estão apresentados na tabela 1. De uma forma geral, a ausência de plasma seminal exerceu efeito deletério sobre o movimento espermático, uma vez que os espermatozoides do tratamento CS apresentaram menores valores de MT ($p<0,05$) e de MP ($p<0,05$); estas variáveis também sofreram declínio com o avançar do tempo ($p<0,05$). As velocidades espermáticas aferidas (VAP, VSL, VCL) não foram afetadas pela ausência do plasma seminal, sendo influenciadas apenas pelo tempo ($p<0,05$), (tabela 2), ocorrendo o mesmo com a população de células hiperativas. Com relação a retineliaridade (STR) e a frequência de batimento de flagelo (BCF), estes também apresentaram menores valores quando os espermatozoides foram conservados sem plasma seminal ($p<0,05$). Não houve efeito de tratamento e nem de tempo sobre a linerialidade (LIN) bem como sobre a amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH).

Tabela 1 - Média \pm erro padrão das características da cinética espermática avaliadas pelo programa Sperm Class Analyser (SCA) da Motilidade total (MT); motilidade progressiva (MP) e frequência de batimento flagelar (BCF, Hz) do espermatozoide suíno refrigerado por 72 h

Características Espermáticas	Tratamentos			Probabilidades		
	NC	CR	CS	Tratamento	Tempo	T*T
MT (%)	75,93 \pm 0,58 ^a	75,34 \pm 0,54 ^a	63,29 \pm 0,88 ^b	<,0001	<,0001	0,2208
MP (%)	62,43 \pm 0,84 ^a	61,36 \pm 0,90 ^a	47,43 \pm 1,03 ^b	<,0001	<,0001	0,4544
BFC (Hz)	3,48 \pm 0,13 ^a	3,52 \pm 0,13 ^a	2,37 \pm 0,05 ^b	0,0045	0,0005	0,0656

Fonte: (LEAL, D. F., 2015)

Legenda: T*T - interação entre tempo e tratamento

^{a,b} Letras minúsculas diferentes na mesma linha, diferem estatisticamente $p < 0,05$ (teste Tukey-Kramer).

Tabela 2 - Média \pm erro padrão das características da cinética espermática avaliadas pelo programa Sperm Class Analyser (SCA) Motilidade total (MT); motilidade progressiva (MP), velocidade de curvilínea (VCL), velocidade progressiva (VSL); velocidade de trajeto (VAP); linearidade (LIN); retilinearidade (STR); amplitude lateral da cabeça (ALH); frequência de batimento flagelar (BCF, Hz) do comportamento do espermatozoide suíno refrigerado no período de 72 h

Características de motilidade	Tempo (h)			
	0	24	48	72
MT (%)	78,43 \pm 0,70 ^a	73,59 \pm 0,79 ^b	69,83 \pm 0,78 ^c	64,00 \pm 0,98 ^d
MP (%)	64,97 \pm 0,87 ^a	59,55 \pm 0,89 ^b	55,97 \pm 0,90 ^c	47,79 \pm 0,88 ^d
VAP (μ m/s)	50,62 \pm 0,86 ^a	58,29 \pm 0,87 ^b	56,02 \pm 0,89 ^c	55,15 \pm 1,04 ^c
VSL (μ m/s)	40,13 \pm 0,89 ^a	42,87 \pm 0,64 ^b	40,63 \pm 0,52 ^a	37,93 \pm 0,75 ^c
VCL (μ m/s)	66,20 \pm 0,85 ^a	73,51 \pm 0,88 ^b	75,47 \pm 0,90 ^c	72,50 \pm 0,89 ^d
BFC (Hz)	3,77 \pm 0,19 ^a	3,26 \pm 0,15 ^a	2,71 \pm 0,06 ^b	2,69 \pm 0,07 ^b
STR (%)	85,27 \pm 0,54 ^a	79,61 \pm 0,58 ^b	74,61 \pm 0,43 ^c	72,11 \pm 0,70 ^d
HIPER(%)	2,24 \pm 0,28 ^a	4,42 \pm 0,55 ^b	6,98 \pm 0,56 ^c	10,13 \pm 1,00 ^d

Fonte: (LEAL, D.F., 20015)

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

7.1.2 Efeito do plasma sêminal sobre a integridade das membranas plasmática e acrossomal

Os resultados da avaliação simultânea das membranas plasmáticas e acrossomal estão descritos na tabela 2.

A conservação de espermatozoides sob refrigeração sem plasma seminal resultou na diminuição ($p < 0,05$) da população de células com membrana plasmática íntegra e acrossomo íntegro (AIMI) bem como levou ao aumento ($p < 0,05$) da categoria de células indesejáveis, ou seja, aquelas com membrana plasmática lesada e acrossomo reagido (ARML). De forma

análoga, a população de células MI e AI foi menor ($p < 0,05$) para os espermatozoides submetidos ao tratamento CS (Tabela 3). A categoria de células AIML, ARML e ARMI aumentaram ($p < 0,05$) ao longo do período de avaliação demonstrando que houve efeito de tempo (Tabela 5).

Tabela 3 - Média ± erro padrão da população de células AIMI (Acrossomo Íntegro e Membrana Plasmática Íntegra), AIML (Acrossomo Íntegro e Membrana Lessada), ARML(Acrossomo Reagido e membrana plasmática Lessada), ARMI (Acrossomo Reagido e Membrana Plasmática Íntegra) expressos em porcentagem (%), de espermatozoides suínos refrigerados por 72 h

Características espermáticas	Tratamentos			Probabilidades		
	NC	CR	CS	Tratamento	Tempo	T*T
AIMI (%)	70,06 ± 0,86 ^a	69,19 ± 0,88 ^a	53,63 ± 0,96 ^b	<,0001	0,1755	0,5650
AIML (%)	8,16 ± 0,36 ^a	9,00 ± 0,49 ^a	10,63 ± 0,53 ^b	0,0008	0,0040	0,7476
ARML (%)	19,09 ± 0,71 ^a	21,94 ± 0,94 ^a	32,76 ± 1,03 ^b	<,0001	0,0406	0,2570
ARMI (%)	2,78 ± 0,19 ^a	3,00 ± 0,21 ^{ab}	3,33 ± 0,20 ^b	0,0230	0,0016	0,6941

Fonte: (LEAL, D.F., 2015)

Legenda: T*T - interação entre tempo e tratamento

^{a,b} Letras minúsculas diferentes na mesma linha, diferem estatisticamente p<0,05 (teste Tukey-Kramer)

Tabela 4 - Média ± erro padrão da população de células MI (Membrana Plasmática Íntegra) e AI(Acrossomo Íntegro) expressos em porcentagem (%), de espermatozoides suínos refrigerados por 72 h avaliados por citometria de fluxo

Características espermáticas	Tratamentos			Probabilidades		
	NC	CR	CS	Tratamento	Tempo	T*T
MI (%)	72,93 ± 0,77 ^a	69,18 ± 0,95 ^a	56,95 ± 1,03 ^b	<,0001	0,1755	0,5650
AI (%)	78,03 ± 0,81 ^a	75,44 ± 0,98 ^a	63,92 ± 1,05 ^b	0,0008	0,0040	0,7476

Fonte: (LEAL, D.F., 2015)

Legenda: T*T - interação entre tempo e tratamento

^{a,b} Letras minúsculas diferentes na mesma linha, diferem estatisticamente p<0,05 (teste Tukey-Kramer)

Tabela 5 - Média \pm erro padrão da população de células AIML (Acrossomo Íntegro e Membrana Plasmática Lesada) ARML (Acrossomo Reagido e Membrana Plasmática Lesada) e ARPI (Acrossomo Reagido e Membrana Plasmática Íntegra), expressos em percentagem (%), de espermatozoides suínos refrigerados avaliados por citometria de fluxo no período de 72 h

Características espermáticas	Tempo (h)		
	0	24	48
AIML (%)	8,02 \pm 0,44	9,28 \pm 0,49	9,67 \pm 0,53
ARML (%)	22,75 \pm 1,31	23,77 \pm 1,26	26,01 \pm 1,39
ARPI (%)	3,43 \pm 0,23	2,75 \pm 0,21	3,23 \pm 0,28
			72
			10,01 \pm 0,61
			25,52 \pm 1,56
			2,90 \pm 0,20

Fonte: (LEAL, D.F., 2015)

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

7.1.3 Efeito do plasma seminal sobre a peroxidação lipídica da membranas espermáticas

Não houve efeito de tratamento sobre esta variável ($p > 0,05$) apenas foi verificado efeito de tempo ($p < 0,05$) o que foi evidenciado pelo aumento da intensidade de emissão de fluorescência pelas células viáveis (IFPERMI) (Tabela 6).

Tabela 6 - Média \pm erro padrão da peroxidação lipídica, medida em intensidade de fluorescência (a.ºu.), de espermatozoides suínos refrigerados avaliados pela citometria de fluxo no período de 72 h

	Tempo (h)			
	0	24	48	72
IFPERMI (a.u)	1056,26 \pm 56,7	1376,96 \pm 86,05	1423,59 \pm 83,80	1440,13 \pm 93,55

Fonte: (LEAL, D. F., 2015)

Legenda: IFPERMI - intensidade de emissão de fluorescência pelas células viáveis

a.u: unidade arbitrária

^{a,b,c,d} Letras minúsculas diferentes na mesma linha, diferem estatisticamente $p < 0,05$ (teste Tukey-Kramer)

7.1.4 Efeito do plasma seminal na manutenção da estabilidade (fluidez) da membrana plasmática

Com relação a esta variável, não houve diferença na intensidade de fluorescência emitida pela Merocianina 540, independente dos tratamentos os quais os espermatozoides foram submetidos ($p > 0,05$). A intensidade de fluorescência emitida foi influenciada apenas pelo tempo, aumentando ao longo dos períodos de avaliação ($p < 0,05$) como fica demonstrando na tabela 7.

Tabela 7 - Média \pm erro padrão da desordem lipídica, expressa em intensidade de fluorescência média (a. u.) de espermatozoides suínos refrigerados, avaliados por citometria de fluxo no período de 72 h

fluorescência (a.u)	Tempo (h)			
	0	24	48	72
	36975,42 \pm 1600,36 ^a	37295,64 \pm 1441,82 ^a	40397,70 \pm 2378,60 ^b	44795,14 \pm 2678,95 ^c

Fonte: (LEAL, D. F., 2015)

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

DISCUSSÃO

8 DISCUSSÃO

O plasma seminal mais que um simples meio de nutrição e transporte para os espermatozoides exerce forte influência sobre as funções bioquímicas destas células (JUYENA; STELLETA, 2012). Hoje já se sabe que este fluido de constituição complexa possui uma variada gama de constituintes que modulam o desenvolvimento e maturação espermática ainda no ambiente testicular (TROEDSSON, 2005), além de atuar nos eventos que precedem a fertilização no trato reprodutivo da fêmea (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011). Com relação a função espermática, o plasma seminal é reconhecido por modular a motilidade (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2008), conferir proteção à membrana plasmática (DOSTÀLOVÀ et al., 1995) bem como salvaguardar os espermatozoides contra a reação acrossomal precoce (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005).

Os espermatozoides pertencentes ao tratamento sem plasma seminal apresentaram menores valores de motilidade total ($p < 0,05$), de motilidade progressiva ($p < 0,05$) e também na frequência de batimento flagelar (BFC) ($p < 0,05$) quando comparados aos demais tratamentos. Outras características do movimento espermático avaliados pelo *sperm class analyser*[®]-CASA[®] como a velocidade de percurso (VAP), velocidade curvilienar (VCL), retilineridade (STR) e a percentagem de espermatozoides hiperativos (HIPER) não foram influenciados pela ausência do plasma seminal ($p > 0,05$). Resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo, foram verificados por Chutia et al. (2014) os quais observaram uma marcada redução da motilidade de espermatozoides suínos conservados sob refrigeração por 72 horas na ausência de plasma seminal. Os achados de Maxwell et al. (1997) reforçam a importância do plasma seminal sobre a fisiologia dos espermatozoides; estes autores, trabalhando com espermatozoides suínos sob altas taxas de diluição para realização de sexagem por citometria de fluxo, observaram uma melhora na motilidade quando 10% de plasma seminal foi incluído às amostras. Granham et al. (1994) reportaram que a conservação de sêmen sem a inclusão de plasma seminal resultou em menor percentagem de células espermáticas móveis; no entanto, vale ressaltar que neste estudo foi utilizado sêmen ovino. Curiosamente, a ausência de plasma seminal em ejaculados criopreservados demonstram ser benéfica no que diz respeito a viabilidade das células espermáticas, diferindo dos achados de trabalhos com sêmen refrigerado. Em estudo conduzido por Kawano et al. (2004) a completa remoção do plasma seminal de ejaculados suínos à serem submetidos ao processo de

criopreservação demonstrou ser favorável para a manutenção da motilidade espermática pós-descongelamento.

Muitos dos efeitos do plasma seminal sobre a biologia das células espermáticas são atribuídas as ações de uma gama variada de proteínas que o compõem (CENTURION et al., 2003), sendo nos suínos as mais importantes aquelas pertencentes à família das espermedesinas que perfazem mais de 90% de todas estas (TÖPFER-PETERSEN et al., 1998). De fato, a adição do heterodímero PSP-I/PSP-II ao meio de incubação dos espermatozoides, resultou em uma maior percentagem de células com alta viabilidade, alta motilidade e alto potencial de membrana mitocondrial quando estes foram incubados por cinco horas a temperatura fisiológica (CENTURION et al., 2003); estes achados foram corroborados por Garcia et al. (2006) os quais observaram um efeito positivo ao adicionar o complexo PSP-I/PSP-II ao meio de incubação de sêmen. Mais recentemente, uma proteína com peso molecular de 30 kDA denominada sp32-like foi identificada no plasma seminal de reprodutores suínos e foi associada com espermatozoides apresentando alta motilidade (ORZOLEK et al., 2015).

A ambiguidade de ações exercidas pelo plasma seminal é um dos grandes motivos que faz deste alvo de exaustivas investigações e os resultados aqui expostos demonstram o seu intrincado mecanismo de ação. No presente estudo, a conservação de espermatozoides sob refrigeração na ausência de plasma seminal, resultou em uma maior percentagem de células com membrana plasmática lesada e acrossomo reagido ($p < 0,05$), porém, ao se avaliar a estabilidade da membrana plasmática de forma individual, por meio da utilização da Merocianina 540, não se observou modificação na emissão de fluorescência, independente de tratamento aplicado ($p > 0,05$), sendo esta apenas alterada em razão do tempo ($p > 0,05$). O mesmo comportamento foi observado ao se avaliar a população de células hiperativas, pelo *sperm class analyser*[®]-CASA[®]; estas variáveis em conjunto dão-nos uma ideia do estado de capacitação dos espermatozoides, todavia, vale ressaltar que, estes eventos podem ocorrer de forma independente uma da outra (MARQUEZ; SUAREZ, 2004).

Com relação a integridade das membranas plasmáticas e acrossomal, as espermedezinas Awn e Aqn-3, a maneira como ocorre com as glicoproteínas da família das Fibronectinas, ligam-se aos fosfolípidos presentes nas membranas dos espermatozoides e, dessa forma, funcionam como ponto de ancoragem para que outras espermedesinas possam se ligar, conferindo estabilidade e, assim, prevenindo que a reação acrossomal ocorra de forma precoce (CABALLERO et al., 2012). Possivelmente esta seja a explicação para os resultados encontrados no presente estudo, uma vez que, com a remoção do plasma seminal, o

espermatozoide estaria desprotegido, tornando-se, dessa forma, mais vulnerável aos danos oriundos do processo de armazenamento sob refrigeração.

Os espermatozoides, espontaneamente, produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) os quais em pequenas quantidades são importantes para que ocorra o desencadeamento da cascata de fosforilação da tirosina associada com a capacitação espermática (AITKEN et al., 2010). No entanto, quando a produção de ROS se sobrepõem a capacidade antioxidante das células espermáticas são gerados, dentre outras alterações, danos peroxidativos à membrana plasmática e fragmentação do DNA nuclear (GUTHRIE;WELCH, 2012). O espermatozoide suíno, quando comparado ao de outros animais domésticos, possuem uma baixa concentração de enzimas antioxidantes, dependendo do plasma seminal para exercer esta função (STRZEZEK et al., 1999). Por sua vez, o plasma seminal possui componentes não enzimáticos e enzimáticos que compõem o sistema de defesa contra os danos gerados pelas ROS, dentre estes as enzimas glutatona peroxidase (GPx), superóxido desmutase (SOD) e a catalase (CAT) são as mais importantes (KOZIOROWSKA-GILUN et al., 2011). Nada obstante, no presente estudo, a intensidade de fluorescência emitida pela sonda C11-BODIPY^{581/591} e captada pelo fotomultiplicador com *band pass* de 530 ± 15 não apresentou efeito de tratamento ($p > 0,05$). Vale ressaltar que como este estudo foi conduzido no verão, talvez possa ter ocorrido uma alteração na função antioxidante do plasma seminal, já que esta pode sofrer modificações sazonais sendo a SOD, por exemplo, uma das enzimas antioxidantes que apresentam baixa concentração em meses quentes (KOZIOROWSKA-GILUN et al., 2011).

Os resultados encontrados no presente estudo e demonstram ser o plasma seminal fundamental para a manutenção das características estruturais e funcionais dos espermatozoide suíno conservado sob refrigeração por 72 horas e deve ser mantido nas doses inseminantes durante todo o período de estocagem.

CONCLUSÕES

9 CONCLUSÕES

1. A conservação de espermatozoides suínos sob refrigeração por 72 horas na ausência de plasma seminal foi deletério para a cinética espermaática
2. A conservação de espermatozoides suínos sob refrigeração por 72 horas na ausência de plasma seminal foi deletério para a integridade das membranas plasmática e acrossomal
3. A conservação de espermatozoides suínos sob refrigeração por 72 na ausência de plasma seminal não exerceu efeito sobre a peroxidação lipídica das membranas
4. A conservação de espermatozoides suínos sob refrigeração por 72 horas na ausência de plasma seminal não influenciou a manutenção da estabilidade (fluidez) da membrana plasmática

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AITKEN, R. J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**, v. 122, p. 497–506, 2001.
- 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.
- ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; MARTINS, S. M. M. K.; PERES, K. R.; BIANCONI, L. L.; ARRUDA, R. P. Seminal plasma reduce acrosome reaction in post-thawed equine spermatozoa. **Animal Reproduction**, v. 3, p. 266, 2006.
- BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; MEDINA, V.; BAUMBER, J.; LIU, I. K. Catalase activity in equine semen. **American Journal Of Veterinary Research**, v. 61, p. 1026-69, 2000.
- BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R.; GALLEGO, M.; TATO, A.; OSADA, J.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1531-1537, 2000.
- BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 1338-1344, 2006
- BROUWERS, J. F.; SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze–thawing. **Theriogenology**, v. 63, p. 458-469, 2005.
- BAILEY, J. L.; LESSARD, C.; JACQUES, J.; BRÈQUE, C.; DOBRINSKI, I.; ZENG, W.; GALANTINO-HOMER, H. L. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. **Theriogenology**, v. 70, p. 1251-1259, 2008.
- BJÖRNDAHL, L.; KVIST, U. Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including zinc bridges. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, p. 23–29, 2010.
- 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
- CALVETE, J. J. Boar spermatozoa in the oviduct. **Theriogenology**, v. 63, p. 514–535, 2005.

CALVETE, J. J.; MANN, K.; SCHAFER, W.; SANZ, L.; REINERT, M.; NESSAU S, RAIDA, M.; TOPFER-PETERSEN, E. Amino-acid-sequence of hsp-1, a major protein of stallion seminal plasma – effect of glycosylation on its heparin-binding and gelatin-binding capabilities. **Biochemistry Journal**, v. 310, p. 615–622, 1995

CALVETE, J. J.; RAIDA, M.; GENTZEL, M.; URBANKE, C.; SANZ, L.; TOPFER-PETERSEN, E. Elation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. **FEBS Letters**, v. 407, p. 201–206, 1997.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 479-488, 2007.

CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; PIZZI, F.; GLIOZZI, T.M. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Reproduction**, v. 121, p. 395–401, 2001.

CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; SURAI, P.; NOBLE, R. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. **Animal Reproduction Science**, v. 58, p. 99–111, 2000.

CHUTIA T, BISWAS, R.K.; TAMULI, M.K.; DEKA, B.C, SINHA, S.; GOSWAMI, J.; BANIK, S.; KAYASTHA, R. B. Effect of holding of semen and washing of seminal plasma on quality and fertility of Hampshire boar semen preserved at liquid state. **Animal Reproduction Science**. v.145, p.141-149, 2014.

CRABO, B. G. Preservation of boar semen: a worldwide perspective. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 1, p. 3-9, 1990

DE AMBROGI, M.; BALLESTER, J.; SARAIVA, F, CABALLERO, I.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; ANDERSSON, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of storage in short-and long-term commercial semen extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 29, p. 543–552, 2006.

DE ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; MARTINS, S. M. M. K.; RAPHAEL, C. F.; MORETTI, A. S. Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 190-194, 2007.

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 post-thawing equine semen: What is the effect on sperm cell viability? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 682-686, 2011.

DE LEEUW, F. E.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A. J. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 1, p. 95–104, 1990.

- DOSTALOVA, Z.; CALVETE, J.J.; TOPFERPETERSEN, E. Interaction of non-aggregated boar AWN-1 and AQN-3 with phospholipid matrices. A model for coating of spermadhesins to the sperm surface. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, v. 376, p. 237–242, 1995.
- DUBÈ, C.; BEAULIEU, M.; REYES-MORENO, C.; GUILLEMETTE, C.; BAILEY, J.L. Boar sperm storage capacity of BTS and Androhep Plus: viability, motility, capacitation, and tyrosine phosphorylation. **Theriogenology**, v. 62, p. 874–886, 2004
- FLESCH, F. M.; BROUWERS, J. F.; NIEVELSTEIN, P. F.; VERKLEIJ, A. J.; VAN GOLDE, L. M.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. M. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. **Journal of Cell Science**, v. 114, p. 3543–55, 2001.
- FLESCH, F. M.; BROUWERS, J. F.; NIEVELSTEIN, P. F.; VERKLEIJ, A. J.; VAN GOLDE, L. M.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. M. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. **Journal of Cell Science**, v. 114, p. 3543–55, 2001.
- GADEA, J. Review: semen extender used in the artificial insemination of swine. **Spanish Journal of Agricultural Reserch**, v. 2, p. 17–27, 2003.
- GERRITS, R.; LUNNEY, J.; JOHNSON, A.; PURSEL, V.; KRAELING, R.; ROHRER, G. Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations. **Theriogenology**, v. 63, p. 283–99, 2005.
- GUTHRIE, H. D.; WELCH, G R. Effects of reactive oxygen species on sperm function. **Theriogenology**.v.78, p.1700-1717, 2012.
- 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.
- 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.
- JASKO, D. J.; MORAN, D. M.; FARLIN, M. E.; SQUIRES, E. L. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoa motion characteristics of cooled stallion semen. **Theriogenology**, v. 35, p. 1059-1067, 1991.
- JOHNSON, L. A.; WEITZE, K. F.; FISER, P.; MAXWELL, W. M. C. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 143–172, 2000.
- JUYENA, N. S.; STELLETA, C. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 16, p. 1-16, 2011.
- KIKKWOOD, R. N.; VADNAIS, M. L.; ABAD, M. Practical application of seminal plasma. **Theriogenology**, v. 70, p. 1364–1367, 2008.
- KOZIOROWKA-GILUN, M.; KOZIOROWSKI, M. STRZEZEK, J. FRASER, L. Seasonal changes in antioxidant defence systems in seminal plasma and fluids of the boar reproductive tract. **Reproductive biology**. v.11, p.37-47, 2011.

- LEWIS, S. E. M.; STERLING, E. S. L.; YOUNG, I. S. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. **Fertility and Sterility**, v. 67, p. 142-7, 1997.
- MAES, D.; NAUWYNCK, H.; RIJSSELAERE, T.; MATEUSEN, B.; VYT, P.; DE KRUIF, A.; VAN SOOM, A. Diseases in swine transmitted by artificial insemination: An overview. **Theriogenology**, v. 70, p. 1337–1345, 2008.
- MADEJ, M.; NORRBY, M.; MADSEN, M. T.; JOAHANNISSON, A.; HANSEN, C.; MADEJ, A. The effect of boar seminal plasma on the release of prostaglandins and interleukin-6nby porcine endometrial and cervical cells and bovine endometrial cells. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 113-124, 2012.
- MARTINS, S. M. M. K.; DE ANDRADE, A. F. C.; ZAFFALON, F. G.; PARAZZI, L. J.; BRESSAN, F. F.; PUGINE, S. M. P.; MELO, M. P.; CHIARRATI, M. R.; MARINO, C. T.; AFONSO, E. R.; MORRETI, A. S.; ARRUDA, R. P. Organic selenium increases PHGPx, but does not affect quality sperm in raw boar semen. **Livestock Science**, v. 164, p. 175-178, 2014
- PURSEL, V. G.; JOHNSON, S. A.; SHUMAN, L. L. Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v. 37, p. 532–535, 1973.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; KVIST, U.; ERNERUDH, J.; SANZ, L.; CALVETE, J.J. Seminal plasma proteins: what role do they play? **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 66, p. 11-22, 2011.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; TIENHAI, P.; JOHANNISSON, A.; VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E.; ROCA, J.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. Boar spermatozoa in the oviduct. **Theriogenology**, v. 63, p. 514–535, 2005.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; TIENHAI, P.; SUZUKI, K.; FUNAHASHI, H.; EKWALL, H.; JOHANNISSON, A. Oviduct involvement in sperm capacitation and oocyte development. **Reproduction**, v. 58, p. 129–145, 2001.
- 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.
- SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D. K.; MCCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. Cooled and Frozen Stallion Semen Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Fort Collins. **Bulletin**, n. 9, p. 1-38, 1999.
- STRZEZEK, J.; LAPKIEWICZ, S. LECEWICZ. A note in the antioxidant capacity of boar seminal plasma. *Animal Science Papers and Reports*. v.17, p.181-188, 1999.
- TÖPFER-PETERSEN, E.; CALVETE, J. J. Sperm-associated protein candidates for primary zona pellucida binding molecules: structure-function correlations of boar spermadhesins. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 50, p. 55–61, 1996
- TÖPFER-PETERSEN, E.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; KIRCHHOFF, C.; LEEB, T.; SIEME, H. The role of stallion seminal plasma proteins in fertilisation. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 159–170, 2005

TROEDSSON, M. H. T.; DESVOUSGES, A.; ALGHAMDI, A. S.; DAHMSD, B.; DOW, C. A.; HAYNA, J.; VALESCO, R.; COLLAHAN, P. T.; MACPHERSON, M. L.; POZOR, M.; BUHI, W. C. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 171–186, 2005.

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.

VISCONTI, P. E.; BAILEY, J.; MOORE, G.; PAN, D.; OLDS-CLARKE, P.; KOPF, G. Capacitation of mouse spermatozoa. Part I. 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.

VIDAMENTA, M.; ECOT, P.; NOUE, P.; BOURGEOISL, C.; MAGISTRINIL, M.; PALMER, E. centrifugation and addition of glycerol at 22°C instead of 4°C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 54, p. 907-919, 2000.

WATSON, P. F. cooling of boar spermatozoa and fertilizing capacity. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 31, p. 135–140, 1996.

WAGNER, H. G.; THIBIER, M. World statistics for artificial insemination in small ruminants and swine. In: Proceedings of the 14th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 14., 2000, Stockholm, Sweden. **Proceedings...** [S.l.]: Elsevier, 2000. v. 2

WEITZE, K. F. Long-term storage of extended boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 1, p. 231-253, 1990.

WHITE, I. G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, p. 639–658, 1993.

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

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 250 μ L)
- 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 μ L 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 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 iodate, 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 20 μ L de PI (solução estoque, 25mg/mL) a 980 μ L de PBS;

Aliquotar em microtubos e armazenar a -20°C.

FITC-PSA

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

Solução de trabalho (100 μ g/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.

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 blocos

Fonte de variação	Graus de liberdade
Tratamento	2
Cachaço (bloco)	5
Resíduo	16
Total	24