ANA PAULA PINOTI PAVANELI

**Influência do plasma seminal oriundo da fração rica do ejaculado sobre a
capacitação e hiperativação espermática em sêmen suíno conservado sob refrigeração à
17 °C por 72 horas**

Pirassununga
2018

ANA PAULA PINOTI PAVANELI

**Influência do plasma seminal oriundo da fração rica do ejaculado sobre a
capacitação e hiperativação espermática em sêmen suíno conservado sob refrigeração
à 17 °C 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

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. André Furugen Cesar de Andrade

De acordo: *André Furugen Cesar de Andrade*

Orientador

Pirassununga
2018

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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. 3660
FMVZ

Pavanelli, Ana Paula Pinoti
Influência do plasma seminal oriundo da fração rica do ejaculado sobre a capacitação e hiperativação espermática em sêmen suíno conservado sob refrigeração à 17 °C por 72 horas / Ana Paula Pinoti Pavanelli. – 2018.
84 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, Pirassununga, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

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

1. Espermatozoide. 2. Armazenamento. 3. Motilidade. 4. Citometria de Fluxo. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Influência do plasma seminal oriundo da fração rica do ejaculado sobre a capacitação e hiperativação espermática em sêmen suíno conservado sob refrigeração à 17°C por 72 horas", protocolado sob o CEUA nº 4962280416, sob a responsabilidade de **André Furugen César de Andrade e equipe; Ana Paula Pinoti Pavaneli** - 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 - está 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, bem como 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/FMZV) na reunião de 18/05/2016.

We certify that the proposal "Influence of seminal plasma from rich fraction of boar ejaculated on capacitation and hyperactivation of the swine sperm stored at 17°C for 72 hours", utilizing 6 Swines (6 males), protocol number CEUA 4962280416, under the responsibility of **André Furugen César de Andrade and team; Ana Paula Pinoti Pavaneli** - 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 - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as 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/FMZV) in the meeting of 05/18/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2016** a **07/2017**

Área: **Reprodução Animal**

Procedência: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Suínos**

sexo: **Machos**

idade: **1 a 4 anos**

N: **6**

Linhagem: **DB Genética Suína**

Peso: **250 a 350 kg**

Resumo: O presente trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos do plasma seminal, oriundo da fração rica do ejaculado, sobre a capacitação e hiperativação espermática do sêmen suíno conservado sob refrigeração à 17°C por 72 horas. Serão obtidos 6 ejaculados de 6 cachasos pelo método da mão enluvada. Em seguida o sêmen in natura será avaliado quanto às características da motilidade pelo sistema computadorizado de análise do sêmen (CASA), morfologia espermática por contraste de interferência diferencial e concentração espermática pela contagem em câmara de Neubauer. 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 resuspendido (CR). A força de centrifugação utilizada será de 500xg por 10 minutos. Todos os tratamentos serão submetidos à diluição em meio BTS para que se obtenha uma concentração de 30×10^6 espermatozoides/mL atingindo um volume final da DI 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 por 72 horas e após tal período, terão suas amostras transferidas para um meio capacitante seguido de acondicionamento em incubadora a 38°C com 5% de CO₂. As mesmas serão avaliadas nos intervalos de 0, 2 e 4 horas, para os seguintes parâmetros: fluidez da membrana plasmática (capacitação), presença da fosforilação do aminoácido tirosina, integridade acrossomal (reação acrossômica), hiperativação e peroxidação da membrana plasmática e do citoplasma. Quando o principal efeito for significativo, as médias serão comparadas pelo teste de Tukey.

Local do experimento: Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos - Suinocultura Experimental - FMVZ/Pirassununga-SP

São Paulo, 21 de maio de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: PAVANELI, Ana Paula Pinoti

Título: **Influência do plasma seminal oriundo da fração rica do ejaculado sobre a capacitação e hiperativação espermática em sêmen suíno conservado sob refrigeração à 17 °C 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 obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

- À *Deus* primeiramente! Agradeço pela vida e por todas as pessoas e oportunidades que colocou em meu caminho até aqui meu Pai. Não há como agradecer à cada um dos personagens envolvidos nesta trama, sem antes te agradecer por tê-los colocado no lugar e momento certo. Agradeço também a *Mãe Aparecida* por sempre passar na frente dos problemas e adversidades, clareando meu caminho.
- Aos avós *Luiz (in memoriam)* e *Alice (in memoriam)* por todo o amor e carinho que sempre tiveram por seus netos. Como eu queria poder contar à todos o orgulho que tenho de vocês dois. Não há como agradecer-los sem me emocionar, sem que a saudade floresça no peito. Vô “Pinotti” e Vó “Licinha”, não tenho dúvidas de que venço todos os meus medos e desafios porque os tenho sempre por perto. Meus eternos anjos da guarda!
- Aos meu pais *Aparecido e Eliete*, agradeço por toda a confiança. Toda palavra de amor, carinho e apoio: “Você vai conseguir filha!” Agradeço pela forma como me cuidaram e educaram. Carrego com muito orgulho cada valor passado por vocês. Obrigada meu pai por me ensinar que com humildade chegamos longe! Obrigada minha mãe por dar colo toda vez que o dia se fez difícil e desanimador. O amor que sinto por vocês é a razão pela qual luto todos os dias. É pra vocês que dedico toda e qualquer vitória. Sempre por vocês!
- Ao *Lucian*, meu melhor amigo e companheiro. Obrigada por esperar! Agradeço pela paciência e pelo apoio nas horas difíceis: “Força linda, você vai conseguir!” Obrigada por me mostrar que sempre valerá a pena lutar. Te amo, meu amor.
- Ao casal *Ana Alice e Celso Rosa*, meus sogros queridos que tenho como minha família. Obrigada por cada palavra de apoio, força e incentivo! Agradeço por todo o carinho.
- À *Bila*, minha madrinha querida. Meu exemplo de mulher forte, guerreira e vencedora. Ao mesmo tempo, doce e amorosa. Dona de um riso que é capaz de apagar qualquer tristeza, acalmar qualquer desespero. Você me inspira, me motiva à seguir sempre em frente.
- Às *Famílias Pinoti e Pavaneli* agradeço por todo o apoio e carinho que sempre dedicaram à mim. Família é base sólida, é para onde sabemos que sempre podemos voltar. Agradeço à Deus por ter cada um de vocês, por ter escolhido à dedo aqueles com os quais eu compartilharia esta vida.
- À amiga *Thaís Garcia*, irmã de alma! Meses sem se ver, muitas vezes sem ao menos conversar, e o que nasceu há muito tempo não muda. Obrigada minha amiga, por torcer e vibrar à cada vitória. Obrigada por me fazer entender o real sentido da palavra amizade.

- Ao meu orientador, *Prof. Dr. André Furugen Cesar de Andrade*, por ter me recebido e acolhido quando cheguei como prática profissionalizante pedindo pra aprender sobre suinocultura. Agradeço por ter acreditado em mim. Agradeço por todo o conhecimento e atenção destinados à mim até aqui. Quando tive medo de enfrentar o que era novo, foi você quem me impulsionou à ir. Obrigada pela oportunidade! Obrigada por mostrar que nada seria fácil, mas que tudo valeria à pena!
- À *Dra. Simone Martins*, agradeço por toda a contribuição. Obrigada Si, por cada vez que sentou pra me ajudar. Exemplo de garra e força que tanto nos inspira. Obrigada pela boa companhia!
- Ao *Prof. Dr. Aníbal Sant'Anna Moretti*, por todos os ensinamentos.
- À *Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celegnini*, pela boa vontade que sempre teve em ajudar.
- Ao *Prof. Dr. Marcílio Nichi e toda a equipe* envolvida na execução de análises complementares à este estudo, realizadas em São Paulo. O meu muito obrigada!
- Aos colegas da equipe do Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos (LATES) e Laboratório de Pesquisa em Suínos, *Gisele, Mariana, Diego, Marina, Cristian, Bruno, Maitê e Denis*. O meu muito obrigada companheiros! Agradeço por toda ajuda, pró-atividade, companheirismo e amizade!
- À amiga *Flávia Freitas* agradeço pelo período de trabalho juntas, por sua companhia e amizade. Obrigada pela prontidão em ajudar sempre que à você eu recorri.
- À amiga *Camylla Pedrosa*! No momento mais difícil estávamos juntas, dividindo um quarto de república. Pouco tempo ali juntas e já sabíamos muito da vida uma da outra. Obrigada por todas as suas palavras amiga, sempre enriquecidas de doçura e bondade. Você é daquelas pessoas que surgem, ficam por um tempo e jamais saem da lembrança.
- Aos Funcionários do Laboratório de Pesquisa em Suínos *Fábio, Chiquinho, Ricardo e Chicão* pela ajuda oferecida durante as atividades conduzidas na Suinocultura Experimental.
- Ao *Prof. Dr. Marc Yeste*, que me acolheu de braços e portas abertas em seu laboratório no período em que lá estive, desenvolvendo parte do meu mestrado na Espanha. Agradeço por todo o tempo e dedicação que disponibilizou em meu favor. Agradeço também cada conselho amigo que recebi. Obrigada Marc, você se tornou um grande exemplo de pessoa e profissional para mim!
- À toda equipe do *Research Center of Biotechnology of Animal and Human Reproduction (Technosperm)* pela forma maravilhosa como me acolheram para a execução de

minhas atividades. Só tenho a agradecer à cada uma das pessoas que cruzou meu caminho durante os meses que estive neste laboratório. Aos professores *Prof. Dr. Joan Enrique Rodríguez-Gil*, *Profa. Dra. Elisabeth Pinart*, *Prof. Dra. Roser Morató*, *Prof. Dra. Isabel Casas* e *Prof. Dr. Sergi Bonet*, que por menor que tenha sido o tempo que estivemos juntos mostraram competência, humildade e muito amor pelo que fazem. Agradeço aqui em especial à *Estela Garcia*, *Prof. Dra. Miriam Castillo-Martín* e *Bruna Chaves* que foram mais do que colegas no laboratório, foram verdadeiras amigas. Obrigada por tudo “chicas”, lembrarei sempre de vocês e de tudo que fizeram por mim, com muito carinho!

- À *Universidade de São Paulo*, em especial à *Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ)* e ao *Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal* pela oportunidade de realização do mestrado.
- À todo o *corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal*, pela contribuição à minha formação profissional. O meu muito obrigada!
- Aos Secretários do Departamento de Reprodução Animal *Clayton Domingues Costa* e *Harumi Doi Shiraishi* pela forma atenciosa e cuidadosa que sempre solucionaram dúvidas e necessidades acadêmicas.
- Aos *colegas do Departamento de Reprodução Animal* pela agradável convivência de sempre.
- À *Maria Laet*, pela prontidão em atender minhas necessidades e pelo excelente trabalho realizado.
- Aos cachacos *Johnny*, *Willy*, *Gilbert*, *Jack*, *Donnie* e *Maguila*, doadores de todo o material biológico (sêmen) utilizado para a execução dos experimentos. Além disso, foram muitos os momentos de alegria e descontração na rotina diária com vocês. Agradeço pela presença de cada um ao longo destes anos. Obrigada “meninos”!
- À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)* pelo apoio financeiro ao Auxílio Pesquisa 2015/14258-5, Bolsa de Mestrado no País 2016/02186-2 e Bolsa de Estágio e Pesquisa no Exterior (BEPE) 2017/20419-7.

RESUMO

PAVANELI, A. P. P. **Influência do plasma seminal oriundo da fração rica do ejaculado sobre a capacitação e hiperativação espermática em sêmen suíno conservado sob refrigeração à 17 °C por 72 horas.** [Influence of seminal plasma from sperm-rich fraction of ejaculate on capacitation and hyperactivation of boar sperm stored at 17 °C for 72 hours]. 2018. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2018.

A refrigeração é a forma mais utilizada para a preservação do sêmen suíno empregado na inseminação artificial. Apesar do constante aprimoramento de diluidores comerciais em favor da manutenção da viabilidade espermática, sabe-se que alterações estruturais e principalmente funcionais ocorrem nestas células em resposta às baixas temperaturas de armazenamento. Além disso, embora tais modificações muitas vezes não sejam identificadas pelas análises de rotina, seus efeitos diretos sobre a capacidade fertilizante do espermatozoide tem sido relatados. Em paralelo, uma gama de estudos buscando identificar possíveis ações do plasma seminal sobre a célula espermática *in vitro* gera ainda resultados bastante controversos. Diante disso, o presente trabalho buscou avaliar como a presença ou não do plasma seminal durante o processo de refrigeração pode influenciar sobre a resposta do espermatozoide suíno aos eventos de capacitação e hiperativação espermática. Para isso, após serem mantidos sobre refrigeração à 17 °C por 72 horas, na presença ou não do plasma seminal, espermatozoides foram submetidos à capacitação *in vitro* e ao decorrer desta, avaliados quanto às características de motilidade pela análise computadorizada do sêmen; e funcionalidade celular por citometria de fluxo. Resultados obtidos à partir das análises de desordem lipídica, translocação da fosfatidilserina e permeabilidade da membrana plasmática mostraram que espermatozoides suínos refrigerados são capazes de responder à capacitação *in vitro* de forma semelhante, independente de prévia manutenção ou não, com o plasma seminal. Para os parâmetros de motilidade, bem como o estudo da população espermática hiperativada, foram apresentados resultados semelhantes entre ambos os grupos, o que demonstra a não influência da prévia exposição ao plasma seminal sobre a mudança do padrão de motilidade espermática. Ainda, parâmetros qualitativos avaliados neste estudo suportam nossa afirmação de que, a ausência de contato entre o espermatozoide suíno e os componentes do plasma seminal durante seu armazenamento não reflete em qualquer efeito prejudicial sobre a qualidade espermática, além de oferecer uma maior resistência à estas células contra lesões de acrossoma ($P < 0,05$). Desta forma, o presente trabalho concluiu que a remoção do plasma seminal previamente ao armazenamento do espermatozoide suíno à 17 °C por 72 horas não é

prejudicial à sua qualidade e funcionalidade, podendo ainda ser benéfica à sua capacidade fertilizante.

Palavras-chave: Espermatozoide. Armazenamento. Motilidade. Citometria de Fluxo.

ABSTRACT

PAVANELI, A. P. P. **Influence of seminal plasma from sperm-rich fraction of ejaculate on capacitation and hyperactivation of boar sperm stored at 17 °C for 72 hours.** [Influência do plasma seminal oriundo da fração rica do ejaculado sobre a capacitação e hiperativação espermática em sêmen suíno conservado sob refrigeração à 17 °C por 72 horas]. 2018. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2018.

Liquid storage is the main form of preservation of boar sperm prior to its use in artificial insemination. Despite the constant improvement of commercial extenders in favor of maintaining sperm viability, it is known that structural and mainly functional alterations occur in these cells in response to low storage temperatures. Furthermore, although these modifications are often not identified by routine analyzes, their direct effects on the fertilizing capacity of spermatozoa have been reported. In view of this, *in vitro* studies aiming to identify possible actions of seminal plasma as modulator of sperm function have yielded controversial results. Therefore, the present work aimed to evaluate how the presence or absence of seminal plasma during liquid storage may influence the responsiveness of spermatozoa to capacitation and hyperactivation events. For this, liquid boar sperm stored at 17 °C for 72 hours in the presence or not of the seminal plasma were submitted to *in vitro* capacitation. During the course, sperm motility characteristics were evaluated by computer-assisted semen analysis; and sperm functionality by flow cytometry. Results obtained from lipid disorder, phosphatidylserine translocation and plasma membrane permeability analyzes have shown that liquid boar sperm stored in the presence or not of seminal plasma are able to respond to *in vitro* capacitation in a similar way. For motility parameters including the study of hyperactivated boar sperm, results were similar for both groups, demonstrating that previous exposure to seminal plasma was not able to influence on sperm motility pattern. In addition, semen quality parameters evaluated in this study support our current observations that the absence of contact between spermatozoa and components of seminal plasma during liquid storage does not reflect any detrimental effect on sperm quality, besides offering greater resistance to these cells against acrosome damages ($P < 0.05$). Therefore, the present study concluded that the removal of seminal plasma prior to liquid storage of boar spermatozoa at 17 °C for 72 hours is not detrimental to its quality and functionality, and may still be beneficial to its fertilizing capacity.

Keywords: Spermatozoa. Storage. Motility. Flow Cytometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cachaços alojados nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Suínos	39
Figura 2 – Esquema experimental representativo.....	40
Figura 3 – Coleta da fração rica do ejaculado suíno.....	41
Figura 4 – Motilidade espermática avaliada pela Análise Computadorizada do Sêmen (CASA)	42
Figura 5 – Gráficos gerados à partir do software BDAccuri C6 para a análise da permeabilidade de membrana.....	46
Figura 6 – Gráficos gerados à partir do software BDAccuri C6 para a análise simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal.....	47
Figura 7 – Gráficos gerados à partir do software BDAccuri C6 para a análise da desordem lipídica na membrana plasmática	48
Figura 8 – Gráficos gerados à partir do software BDAccuri C6 para a análise da translocação da fosfatidilserina na membrana plasmática.....	49
Figura 9 – Gráficos gerados à partir do software BDAccuri C6 para a análise do potencial de membrana mitocondrial (PMM).....	50
Figura 10 – Gráficos gerados à partir do software BDAccuri C6 para a análise do estresse oxidativo citoplasmático.....	51
Figura 11 – Gráficos gerados à partir do software BDAccuri C6 para a análise da peroxidação lipídica da membrana plasmática	52
Figura 12 – Esquema representativo do prévio experimento realizado para a caracterização do padrão de motilidade apresentado pelo espermatozoide suíno hiperativado.....	80
Figura 13 – Padrão cinético de espermatozoide suíno não hiperativado.....	82
Figura 14 – Padrão cinético de espermatozoide suíno hiperativado	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características de motilidade apresentadas por espermatozoides suínos refrigerados por 72 horas, na presença (MPS) ou não (RPS) do plasma seminal	55
Tabela 2 – Características de motilidade apresentadas por espermatozoides suínos submetidos à capacitação in vitro, após terem sido refrigerados na presença (MPS) ou não do plasma seminal (RPS).....	56
Tabela 3 – Avaliação da permeabilidade de membrana em espermatozoides suínos submetidos à capacitação in vitro, após terem sido refrigerados na presença (MPS) ou não do plasma seminal (RPS).....	57
Tabela 4 – Avaliação simultânea da integridade de membranas plasmática e acrossomal em espermatozoides suínos submetidos à capacitação in vitro, após terem sido refrigerados na presença (MPS) ou não do plasma seminal (RPS)	58
Tabela 5 – Avaliação da desordem lipídica e translocação da fosfatidilserina em membrana plasmática de espermatozoides suínos submetidos à capacitação in vitro, após terem sido refrigerados na presença (MPS) ou não do plasma seminal (RPS)	59
Tabela 6 – Porcentagem de espermatozoides viáveis apresentando alto potencial de membrana mitocondrial (PMM) quando submetidos à capacitação in vitro, após terem sido refrigerados na presença (MPS) ou não do plasma seminal (RPS)	59
Tabela 7– Avaliação do estresse oxidativo citoplasmático e peroxidação de membrana em espermatozoides suínos submetidos à capacitação in vitro, após terem sido refrigerados na presença (MPS) ou não do plasma seminal (RPS)	60
Tabela 8 – Efeito de tratamento (P), valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação obtidos para cada uma das características a partir da diferença entre valores de amostras induzidas e não induzidas à hiperativação espermática.....	81
Tabela 9 – Médias de ambos os tratamentos corrigidas pelo acréscimo ou subtração de três desvios padrões.....	81
Tabela 10 – Características de motilidade apresentadas por espermatozoides suínos submetidos à capacitação in vitro, após terem sido refrigerados na presença (MPS) ou não do plasma seminal (RPS).....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma
µM	micromolar
µm	micrômetro
ALH	amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide
API	espermatozoides com membranas acrossomal e plasmática íntegras
ALPL	espermatozoides com membranas acrossomal e plasmática lesadas
AIPL	espermatozoides com membrana acrossomal íntegra e plasmática lesada
ALPI	espermatozoides com membrana acrossomal lesada e plasmática íntegra
ATP	adenosina trifosfato
BCF	frequência do batimento flagelar cruzado
BSA	albumina sérica bovina
BTS	<i>Beltville Thawing Solution</i>
C11-BODYPY ^{581/591}	4,4- difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoic acid
cAMP	adenosina monofosfato cíclico
CASA	Computer-Assisted Semen Analysis (Análise Computadorizada do Sêmen)
CTA-PS	capacidade total antioxidante do plasma seminal
DHE	dihidroetídio
DIC	contraste de interferência diferencial
DNA	ácido desoxirribonucleico
EROs	espécies reativas de oxigênio
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FITC-PSA	aglutinina de <i>Pisum sativum</i> conjugada ao isotiocianato de fluoresceína
FL1	filtro 1 de captação da emissão de fluorescência
FL2	filtro 2 de captação da emissão de fluorescência
FL3	filtro 3 de captação da emissão de fluorescência
FL4	filtro 4 de captação da emissão de fluorescência
FR	fração rica do ejaculado

h	horas
HYPER	espermatozoides hiperativados
Hz	Hertz
IA	inseminação artificial
ICa ²⁺	ionóforo de cálcio
JC-1	5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
LIN	linearidade
Log	logaritmo
M540	Merocianina 540
MC	meio capacitante
mg	miligrama
MIF	mediana da intensidade de fluorescência
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
MPS	tratamento com manutenção do plasma seminal
MP	motilidade progressiva
MT	motilidade total
n	número de unidades experimentais
nm	manômetro
P	nível de significância
PI	iodeto de propídio
PMM	potencial de membrana mitocondrial
FS	fosfatidilserina
s	segundos
SAS	<i>Statistical Analysis System</i> (Sistema de Análise Estatística)
SCA	<i>Sperm Class Analyzer</i> (software - análise da motilidade espermática)
SEM	erro padrão da média
sptz	espermatozoides
STR	retilinearidade
RAP	espermatozoides rápidos
RPS	tratamento com prévia remoção do plasma seminal
TALP	meio de Tyrode com albumina, lactato e piruvato
VAP	velocidade média de percurso

VCL	velocidade curvilinear
VSL	velocidade em linha reta
WOB	índice de oscilação

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
>	maior
<	menor
×	vezes
±	mais ou menos
v:v	proporção de volumes
g	gravidade
/	por
10 ⁶	milhões
+	positivo
-	negativo
=	igual
:	para (1:1000)
®	marca registrada
°C	graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM SUÍNOS E UTILIZAÇÃO DE SÊMEN REFRIGERADO	25
2.2 ESPERMATOZOIDE SUÍNO E O PROCESSO DE REFRIGERAÇÃO	26
2.3 PLASMA SEMINAL E SUA ATUAÇÃO <i>IN VITRO</i>	27
2.4 CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA.....	30
2.5 REAÇÃO ACROSSOMAL	31
2.6 HIPERATIVAÇÃO ESPERMÁTICA.....	31
2.7 PLASMA SEMINAL SOBRE A CAPACITAÇÃO E HIPERATIVAÇÃO ESPERMÁTICA	33
3 HIPÓTESES	35
4 OBJETIVOS	37
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
5.1 LOCAL E PERÍODO EXPERIMENTAL	39
5.2 ANIMAIS	39
5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	40
5.4 COLETA DO SÊMEN E AVALIAÇÕES ESPERMÁTICAS INICIAIS.....	41
5.5 PROCESSAMENTO E CONSERVAÇÃO DO SÊMEN SUÍNO REFRIGERADO	42
5.6 CAPACITAÇÃO <i>IN VITRO</i>	43
5.7 ANÁLISE COMPUTADORIZADA DO SÊMEN (CASA).....	43
5.8 ANÁLISES POR CITOMETRIA DE FLUXO	44
5.8.1 Exclusão de debris celulares (SYTO-59)	45
5.8.2 Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática (PI/YO-PRO-1)	45

5.8.3 Avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal (PI/FITC-PSA).....	46
5.8.4 Avaliação da desordem lipídica em membrana plasmática (YO-PRO-1/M540)	47
5.8.5 Avaliação da translocação do fosfolípido fosfatidilserina na membrana plasmática (PI/Annexin V-FITC)	48
5.8.6 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PI/JC-1)	49
5.8.7 Avaliação do estresse oxidativo citoplasmático (YO-PRO-1/DHE)	51
5.8.8 Avaliação da peroxidação lipídica em membrana plasmática (PI/C11-BODIPY ^{581/591}).....	52
5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
6 RESULTADOS	55
6.1 MOTILIDADE ESPERMÁTICA	55
6.2 CITOMETRIA DE FLUXO	56
6.2.1 Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática	56
6.2.2 Avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal	57
6.2.3 Avaliação da desordem lipídica e translocação do fosfolípido fosfatidilserina na membrana plasmática	58
6.2.4 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PMM)	59
6.2.5 Avaliação do estresse oxidativo citoplasmático e peroxidação lipídica da membrana.....	60
7 DISCUSSÃO	62
8 CONCLUSÕES.....	67
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
REFERÊNCIAS	71
APÊNDICE A	80
APÊNDICE B.....	84

1 INTRODUÇÃO

---

1 INTRODUÇÃO

Os inúmeros benefícios advindos da inseminação artificial (IA) fazem desta técnica uma importante ferramenta para o aumento da produtividade aliada à qualidade. Na suinocultura, o emprego da IA associado ao uso do sêmen refrigerado (15-17 °C) é prática amplamente implantada nas granjas comerciais (JOHNSON et al., 2000). O sêmen suíno refrigerado, presente em mais de 95% das IAs realizadas, na maior parte dos casos compreende à diluição da fração rica do ejaculado em diluidor próprio para seu armazenamento com posterior fracionamento em doses inseminantes. As doses apresentam volume e concentração que variam entre 50-100 mL e 1-3 bilhões de espermatozoides, respectivamente, dependendo de qual técnica de inseminação artificial for usada (YESTE, 2017).

Apesar do constante aprimoramento de diluidores comerciais em busca de melhor manutenção da viabilidade espermática por maiores períodos de estocagem, uma considerável perda do potencial fertilizante destas células pode ser observada dentro dos três primeiros dias de armazenamento (WABERSKI; HENNING; PETRUNKINA, 2011). Para explicar a maior susceptibilidade do espermatozoide suíno à baixas temperaturas em relação à outras espécies, a baixa proporção de colesterol/fosfolípido encontrada em sua membrana plasmática certamente é um fator justificante. Isto porque, uma vez conhecida a importância do colesterol para a estabilização da membrana plasmática, sua presença em menor quantidade na espécie suína corrobora para uma membrana mais fluida e portanto, mais permeável e susceptível à alterações estruturais e funcionais (DE LEEUW et al., 1990).

Proteínas, lipídios, substâncias hormonais e antioxidantes são alguns dos componentes que constituem o rico fluido que banha os espermatozoides conforme os mesmos são liberados do epidídimo durante a ejaculação. Tal produto corresponde ao conjunto de secreções advindas de diferentes estruturas do sistema reprodutivo masculino e recebe a denominação de plasma seminal (JUYENA; STELLETA, 2012). Estudos relatam que a atuação deste fluido vai muito além do transporte e nutrição das células espermáticas após a ejaculação, estando sua presença intimamente relacionada à interação do espermatozoide com o sistema reprodutivo feminino e consequente sucesso da fertilização (ROZEBOOM et al., 2000; O'LEARY et al., 2004; KACZMAREK; KRAWCZYNSKI; FILANT, 2013).

Entretanto, diante das diferentes frações ejaculadas pelo cachão e consequente variação na composição do plasma seminal presente em cada uma delas, estudos sugerem a importância de avaliá-las separadamente (PEÑA et al., 2006; SARAVIA et al., 2007;

DZIEKOŃSKA et al., 2017). Isto porque, a coleta do sêmen suíno é uma situação completamente diferente do que acontece fisiologicamente na monta natural, onde não necessariamente as diferentes frações do ejaculado e os constituintes do plasma seminal permanecem juntos como no copo de coleta, uma vez que são depositadas por pulsos ejaculatórios no trato reprodutivo feminino, em ordem sequencial. Este pode ser o fator pelo qual muitas vezes a atuação do plasma seminal aparece como dupla, ora benéfica, ora prejudicial à viabilidade da célula espermática (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

Estudos com criopreservação tem demonstrado uma melhor resistência de espermatozoides provenientes da fração rica do ejaculado aos danos causados pelo choque frio, sendo tal fato atribuído à composição do plasma seminal que os acompanha nesta porção (SARAVIA et al., 2009; HOSSAIN et al., 2011). Além disso, ALKMIN et al. (2014) e TORRES et al. (2016) comprovam com seus estudos que a adição do plasma seminal provenientes desta mesma fração durante o descongelamento de espermatozoides criopreservados é capaz de atuar sobre tais células e melhorar sua viabilidade.

Entretanto, ainda à respeito do emprego do plasma seminal *in vitro* e sua atuação sobre a célula espermática, resultados contraditórios podem ser encontrados na literatura. Enquanto alguns autores afirmam que a presença do plasma seminal é capaz de melhorar parâmetros como motilidade e integridade de membrana plasmática (OKAZAKI et al., 2009; OKAZAKI; SHIMADA, 2012; GÓMEZ-FERNÁNDEZ et al., 2012), outros relatam seu efeito deletério (FERNÁNDEZ-GAGO; DOMÍNGUEZ; MARTÍNEZ-PASTOR, 2013). Quando estudada a possível atuação do plasma seminal sobre a capacitação espermática, proteínas espermadesinas, principais representantes proteicas do plasma seminal, demonstraram ser capazes de inibir a capacitação espermática *in vitro*, certamente ao promoverem a estabilização da membrana plasmática (VADNAIS; ROBERTS, 2010).

Apesar de escassos os relatos à respeito da atuação do plasma seminal sobre a hiperativação espermática na espécie suína, Schmidt e Kamp (2004) relataram a necessidade de níveis 10 vezes mais altos de Ca^{2+} para a indução do padrão de motilidade hiperativado em espermatozoides na presença de plasma seminal em relação àqueles previamente isolados do fluido. A possível explicação dos autores está relacionada à presença de citrato no plasma seminal, importante quelante de cálcio, ou mesmo a presença dos “fatores decapacitantes”, os quais bloqueiam a abertura de canais de íons, impedindo o influxo de importantes ativadores de vias sinalizadoras relacionadas não só à hiperativação espermática, como por todo o processo de capacitação e posterior reação acrossomal.

Diante da literatura consultada, resta a dúvida de como a interação entre plasma seminal e espermatozoide suíno durante sua refrigeração é capaz de influenciar a forma como tal célula responderá aos eventos de capacitação e hiperativação espermática posteriormente à inseminação artificial. O armazenamento do sêmen suíno sob refrigeração é uma situação comumente vivenciada por granjas comerciais, o que torna clara a necessidade de estudo à cerca de como a manutenção ou não, do plasma seminal, pode contribuir para o potencial fertilizante destas células.

2 REVISÃO DE LITERATURA

---

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta sessão encontram-se abordados em tópicos os temas que foram base para a criação das hipóteses deste estudo.

2.1 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM SUÍNOS E UTILIZAÇÃO DE SÊMEN REFRIGERADO

A história da IA na suinocultura é marcada por uma evolução lenta e de uso restrito até o final da década de 80. A partir dos anos 90, quando a técnica foi então consolidada no cenário mundial, melhoras no manejo reprodutivo puderam ser observadas ao passo que a técnica substituiu a monta natural em grandes sistemas de criação (SILVEIRA; SCHEID, 2002). No Brasil, os primeiros relatos de uso da técnica correspondem ao final de 1940, muito embora os mesmos sejam considerados apenas tentativas experimentais. Os primeiros programas comerciais de IA, de fato implantados, ocorreram na década de 1970, período de profundas modificações na criação de suínos em nosso país (BORTOLOZZO; WENTZ, 1995).

Atualmente, a IA está amplamente difundida e é a principal ferramenta responsável pela expansão da suinocultura, contribuindo para ganhos na área reprodutiva, genética e sanitária (KNOX, 2016). Entre as diferentes técnicas disponíveis para a espécie suína, apesar da convencional ou intracervical (IAC) ser ainda hoje majoritariamente utilizada nos sistemas de produção, o uso de técnicas que visem a deposição de espermatozoides mais próximo ao local de fertilização, como é o caso da inseminação artificial intrauterina (IAIU) por exemplo, tem se tornado ponto de interesse e maior exploração à campo. Isto porque, além de sua fácil inserção no sistema, o menor número de espermatozoides necessário para o seu sucesso possibilita um melhor aproveitamento de reprodutores geneticamente superiores (BORTOLOZZO et al., 2015). Independente da técnica escolhida, alguns fatores como o treinamento da equipe de funcionários e o emprego de boas práticas laboratoriais podem refletir diretamente em seu sucesso. Entretanto, o emprego de doses inseminantes de alta qualidade é essencial para a obtenção de uma boa performance reprodutiva, o que está intimamente ligado a forma como o sêmen coletado é processado e preservado até o dia de seu uso (YESTE, 2017).

Apesar da possibilidade de criopreservação do espermatozoide suíno e entre outros benefícios, a preservação deste material por longos períodos, 95% das IAs realizadas na

suinocultura ainda correspondem ao uso do sêmen refrigerado. O prático preparo de doses inseminantes sob tais condições, e principalmente as altas taxas reprodutivas alcançadas com seu uso corroboram para a estabilidade de seu emprego no setor (RODRÍGUEZ-GIL; ESTRADA, 2013). Além disso, a elevada sensibilidade do espermatozoide suíno ao processo de criopreservação, e consequente menor potencial fertilizante após descongelamento (KNOX, 2015), tornam difícil a implantação da biotecnologia em escala comercial.

2.2 ESPERMATOZOIDE SUÍNO E O PROCESSO DE REFRIGERAÇÃO

Entre as particularidades encontradas na espécie suína, o grande volume de ejaculado produzido por um cachão é algo a se considerar, podendo este chegar a 500 mL. Outra fator é que o ejaculado suíno compreende diferentes frações, as quais podem ser facilmente identificadas durante a coleta, pela sequência com a qual aparecem e a densidade que apresentam (DZIEKOŃSKA et al., 2017). A primeira delas é conhecida por fração pré-espermática, constituída por produtos secretados pelas glândulas bulbouretrais e próstata. Na sequência, é possível observar a fração rica do ejaculado, riquíssima em células espermática e fluido epididimário e portanto, eleita para a preparação de doses inseminantes. Após esta, uma fração menos encorpada recebe o nome de fração pobre/fração pós-espermática, que como o próprio nome sugere, apresenta número reduzido de células espermáticas envolvidas em grande quantidade de fluido secretado pelas vesículas seminais, próstata e mais ao fim, pelas glândulas bulbouretrais. Ainda, ejaculada principalmente no início e final da ejaculação, a fração gelatinosa apesar de importante para a monta natural, é desprezada nos casos de coleta (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2005).

A primeira estrutura susceptível à lesões durante os processos de estocagem à baixas temperaturas é sem dúvida a membrana plasmática espermática (MEDRANO; WATSON; HOLT, 2012). No caso da espécie suína, sua particular composição e distribuição dos fosfolipídios parece torná-la ainda mais frágil. Em relação à outras espécies domésticas, o suíno apresenta a menor proporção de colesterol/fosfolipídio (0,12), enquanto bovinos e ovinos apresentam proporções equivalentes à 0,38 e 0,36, respectivamente (DE LEEUW et al., 1990). Isto está diretamente relacionado ao quão fluida se encontra esta estrutura, uma vez que o colesterol é um estabilizador de membrana e seu efluxo está intimamente ligado à ativação das vias de capacitação espermática e consequente reação acrossomal (SHADAN et al., 2004). Desta forma, não somente a perda de integridade da membrana plasmática, mas

sim uma simples desorganização ou alteração de seus canais de íons podem ser suficientes para acarretar em eventos irreversíveis e condizentes com a perda do potencial fertilizante destas células após sua estocagem (HENNING et al., 2012).

Outro importante desafio encontrado pela célula espermática durante seu armazenamento inclui o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), aliado a perda da capacidade de neutralizá-las pelos antioxidantes presentes no meio (CEROLINI et al., 2000; KUMARESAN et al., 2009). A geração de tais produtos pela célula espermática é um evento fisiológico, o qual inclusive tem sido relatado como essencial para o acontecimento de eventos preparatórios à fertilização (FERRAMOSCA; ZARA, 2014; GADELLA; BOERKE, 2016). Entretanto, uma vez que tal produção deixa o estado fisiológico por alguma razão e não pode ser mais compensada pelas substâncias antioxidantes resulta no evento conhecido como estresse oxidativo. Á partir de então, substratos como os ácidos graxos poliinsaturados presentes na membrana plasmática ficam expostos à ação das EROs e consequente lipoperoxidação, o que inevitavelmente confere danos à viabilidade e funcionalidade do espermatozoide pós refrigeração (AITKEN; JONES; ROBERTSON, 2012).

Ainda, estudos avaliando os efeitos da refrigeração sobre a funcionalidade da célula espermática após seu armazenamento tem demonstrado algo muito interessante. Diante das análises rotineiramente empregadas para avaliação de doses inseminantes, focadas em detectar danos letais à célula espermática, autores relatam que alterações subletais, altamente relacionadas com o potencial fertilizante da célula, passam muitas vezes despercebidos (WABERSKI; HENNING, PETRUNKINA, 2011; HENNING et al., 2012). Desta forma, a submissão de espermatozoides previamente refrigerados à condições *in vitro* que mimetizem àquelas *in vivo* pós-inseminação artificial, pode ser considerada uma ótima ferramenta para avaliar também como os efeitos do processo de armazenamento atuam sobre a capacidade de resposta do espermatozoide à fatores externos (HENNING et al., 2012).

2.3 PLASMA SEMINAL E SUA ATUAÇÃO *IN VITRO*

O sêmen é composto por duas porções, uma celular representada pelos espermatozoides, e outra acelular, correspondente ao plasma seminal. O plasma seminal é um fluido biológico extremamente complexo, resultante da mistura de diferentes secreções produzidas por estruturas do trato reprodutivo masculino tais como: testículos, epidídimo e glândulas sexuais acessórias. Este produto secretório desempenha importante papel não

somente sobre a fisiologia espermática, mas também no processo de fertilização. Vários componentes orgânicos e inorgânicos compõem o plasma seminal como aminoácidos, proteínas, íons, bicarbonato, produtos antimicrobianos, lipídios e uma gama variada de substâncias hormonais (VADNAIS; ALTHOUSE, 2011; JUYENA; STELLETTA, 2012).

Diante da constante busca por melhorias nas biotecnologias da reprodução, diversos estudos tem buscado na complexidade do plasma seminal, material para identificar importantes substâncias relacionadas à preservação e capacidade fertilizante da célula espermática. Neste contexto, proteínas parecem ser o foco para importantes descobertas (DASKALOVA et al., 2014; GONZÁLEZ-CADAVID et al., 2014). Isto porque, além de presentes em consideráveis quantidades no plasma seminal, sua capacidade de ligação à célula espermática no momento da ejaculação parece influenciar não somente sobre a funcionalidade do espermatozoide, mas também interagir e modular eventos fisiológicos no trato reprodutivo feminino (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

O principal grupo de proteínas identificado no plasma seminal de cachacos é representado pelas espermedesinas e corresponde a 90% de toda a fração proteica existente. Proteínas ligantes à heparina (AQN-1, AQN-3 e AWN) ou não (PSP-I e PSP-II), representam juntas este grupo e estão relacionadas à processos como capacitação espermática, formação do reservatório espermático e fertilização (CABALLERO et al., 2008; RODRÍGUEZ-MARTINEZ et al., 2011; GONZÁLEZ-CADAVID et al., 2014). Além das proteínas, o fato do espermatozoide possuir pouquíssimas reservas antioxidantes para o combate das EROs, propriedades antioxidantes tem sido outros importantes constituintes do plasma seminal à ganhar destaque. Em suínos, mensurações da capacidade total antioxidante do plasma seminal (CTA-PS) já foram relacionadas não só à sobrevivência da célula espermática como também à sua capacidade fertilizante (BARRANCO et al., 2015).

No que diz respeito ao emprego do plasma seminal *in vitro* na espécie suína, principalmente sobre os danos causados em virtude dos processos de estocagem, sua ação ainda hoje continua sendo controversa. Entretanto, alguns autores relatam que a qualidade e a performance reprodutiva de espermatozoides criopreservados pode ser melhorada quando estes são expostos ao plasma seminal na etapa de descongelamento. A supressão de eventos relacionados à capacitação e reação acrossomal, bem como o aumento da porcentagem de espermatozoides móveis e viáveis foram alguns dos importantes ganhos atribuídos à posterior exposição ao plasma seminal (OKAZAKI et al., 2009; GARCÍA et al., 2010). Além disso, Vadnais & Roberts (2010) demonstraram a participação do plasma seminal como fator inibitório da capacitação espermática, seja esta induzida por baixas temperaturas (5 °C) ou

mesmo sob condições *in vitro*, identificando as proteínas espermedesinas AQN-3, AWN e AQN-1 como principais responsáveis por tal atuação do plasma seminal. Ainda, os autores sugerem que o efeito decapacitante desempenhado pelas mesmas seja reversível, de forma que ao serem removidas os espermatozoides estão aptos à se tornam capacitados.

Em busca de possíveis atuações do plasma seminal como modulador da funcionalidade espermática na espécie suína, alguns fatores devem ser levados em consideração diante da variabilidade de resultados encontrados na literatura. O primeiro deles é a particularidade do ejaculado suíno, constituído por diferentes frações espermáticas acompanhadas por plasma seminal com composições sabidamente particulares à cada uma delas (PEÑA et al., 2006; ALKMIN et al., 2014; PEREZ-PATÍÑO et al., 2016). O segundo, intimamente relacionado ao primeiro, corresponde ao fato de que a coleta do sêmen para uso na inseminação artificial não é um processo fisiológico (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011), e promove a exposição do espermatozoide ao plasma seminal de todas as frações ejaculadas de uma só vez, o que muito provavelmente não ocorra durante a monta natural. Ainda, fatores de indivíduo e ejaculado (BARRANCO et al., 2015), bem como de sazonalidade (KOZIOROWSKA-GILUN et al., 2011), já foram descritos para a variação da composição do plasma seminal na espécie.

Assim como na espécie suína, a atuação do plasma seminal sobre o espermatozoide durante o processo de armazenamento também é algo incerto para reprodutores de outras espécies como a bovina e a equina. Em geral, sua participação pode atuar de forma benéfica, indiferente ou mesmo prejudicial aos parâmetros de viabilidade celular. Entre os possíveis fatores associados à esta variação na influência exercida pelo plasma seminal, autores atribuem à concentração de alguns constituintes em sua composição, bem como o tempo pelo qual os espermatozoides permanecem expostos à estes (BERGERON; MANJUNATH, 2006; MOORE; SQUIRES; GRAHAM, 2005).

Na rotina da suinocultura, o preparo de doses inseminantes refrigeradas constitui-se basicamente da coleta do ejaculado, em seu volume total ou fracionado, e sua subsequente extensão em diluidores comerciais de refrigeração, os quais se comprometem a manter a viabilidade espermática por períodos de estocagem que se estendem de curtos (3 à 4 dias) à extra longos (mais de 8 dias) (PINART et al., 2015). Dentro deste processamento, todo o plasma seminal que acompanha os espermatozoides é mantido e acaba por ser diluído. De fato, quando avaliada a importância deste plasma seminal durante a refrigeração (15-17 °C) por 72 horas, autores descrevem que sua presença é fundamental para garantir parâmetros de qualidade espermática como motilidade e integridade de membranas plasmática e acrossomal

(CHUTIA et al., 2014; LEAL et al., 2018, no prelo), estruturas sabidamente indispensáveis para o sucesso da fertilização. No entanto, pouco se sabe sobre a funcionalidade destas células pós armazenamento, até que ponto o prévio contato com constituintes do plasma seminal pelo período de 72 h é capaz de modular a resposta espermática à eventos como a capacitação e hiperativação, por exemplo.

2.4 CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA

Indícios ainda muito abstratos à respeito da importância da capacitação espermática foram relatados pela primeira vez, pelos autores Chang (1951) e Austin (1952), ao observarem que a permanência do espermatozoide no sistema reprodutivo feminino por um período de tempo era indispensável à fertilização. Deste modo, a capacitação espermática nada mais é do que um conjunto de etapas preparatórias pelas quais a célula espermática deve passar à fim de se tornar apta à fertilizar o oócito. São processos fisiológicos que envolvem entre outros aspectos, a reorganização da membrana plasmática, regulação de canais de íons e alterações no padrão de fosforilação de diversas proteínas (VISCONTI et al, 2011; GADELLA; BOERKE, 2016).

Uma vez depositados no sistema reprodutivo da fêmea, somente uma pequena parcela dos espermatozoides serão conduzidos até porções da tuba uterina, onde permanecem aderidos ao epitélio durante o período pré e peri-ovulatório, formando o reservatório espermático. Acredita-se que este seja o momento onde a capacitação é iniciada (LÓPEZ-ÚBEDA; MÁTAS, 2015). Alguns autores sugerem que o processo de capacitação aconteça em duas fases. A primeira delas, conhecida como “eventos rápidos”, compreende basicamente a ativação da motilidade espermática pelo bicarbonato presente no plasma seminal, ao passo que espermatozoides de pouquíssima ou nula motilidade, deixam a cauda do epidídimo. Já a segunda, caracterizada por “eventos lentos”, representa de fato a preparação da célula espermática à fertilização, onde se torna apta à reação acrossomal e mais uma mudança nos padrões de motilidade, conhecida como hiperativação espermática (VISCONTI, 2009).

Acredita-se que a remoção de fatores estabilizadores/protetores da membrana plasmática, como é o caso do colesterol intrínseco em sua composição e proteínas advindas do plasma seminal, seja a precursora para que a capacitação ocorra. A remoção de tais fatores culmina com uma membrana plasmática mais fluida, o que permite a reorganização estrutural de fosfolípidios e proteínas e o surgimento de novos microdomínios, importantes para a

posterior reação acrossomal e fertilização (GADELLA et al., 2008). Além disso, canais de íons tem sua atividade alterada, permitindo o influxo de cálcio e bicarbonato, importantes sinalizadores que ativarão as vias da capacitação (LÓPEZ-ÚBEDA; MATÁS, 2015).

2.5 REAÇÃO ACROSSOMAL

A reação acrossomal, evento dependente das alterações pelas quais o espermatozoide passa durante a capacitação, é indispensável para que a fertilização aconteça. Isto porque, antes de fertilizar o oócito, a célula espermática precisa transpassar a zona pelúcida, barreira glicoproteica comum aos oócitos de todas as espécies mamíferas (YANAGIMACHI, 1994). Ao contrário das etapas preparatórias sobre as quais foi submetido, esta é irreversível e pode resultar em uma célula sem capacidade fecundante caso aconteça sob condições *in vitro*, nas quais ainda não se tenha a intenção de fertilizar (HOSSAIN et al., 2011).

Sob condições *in vivo*, uma sequência de eventos acontece durante o processo pelo qual o espermatozoide consegue adentrar e ativar o oócito. De forma simplificada, as etapas correspondem a: 1) ligação do espermatozoide à zona pelúcia; 2) liberação de enzimas hidrolíticas armazenadas no compartimento acrossomal; 3) degradação da zona pelúcida; 4) fusão das membranas do espermatozoide com a do oócito e por fim 5) penetração e ativação do gameta feminino (FLESCH; GADELLA, 2000).

2.6 HIPERATIVAÇÃO ESPERMÁTICA

Em 1969, Yanagimachi reportou a hiperativação espermática pela primeira vez ao observar que espermatozoides de hamster tornavam-se extremamente ativos conforme adquiriam habilidade para fertilizar oócitos *in vitro*. Décadas mais tarde, o padrão de motilidade apresentado pelo espermatozoide hiperativado foi caracterizado por movimentos vigorosos e não progressivos, ocasionados por batimentos flagelares assimétricos de alta amplitude (YANAGIMACHI, 1994).

Além de sua importância para a penetração da zona pelúcida pelo espermatozoide (STAUSS et al., 1995; BEDFORD, 1998), a hiperativação tem sido relacionada à outras etapas prévias à fertilização, sendo considerada crucial para o sucesso desta. A primeira delas compreende a necessidade de movimentos vigorosos para que o espermatozoide consiga se desprender do epitélio da tuba uterina, uma vez alojados no reservatório espermático (CHANG; SUAREZ, 2010). Em um segundo momento, um maior impulso seria necessário

para transpassar substâncias viscoelásticas, como o muco secretado pelo epitélio e a própria matriz do *cumulus oophorus* (SUAREZ et al., 1991; QUILL et al., 2003; CHANG; SUAREZ, 2010), justificando a presença de espermatozoides hiperativados no local e momento da fertilização (SUAREZ; HO, 2003). Apesar do padrão de motilidade hiperativada ser muitas vezes observado após incubação de espermatozoides sob condições capacitantes, estudos comprovam que os eventos capacitação e hiperativação espermáticas não são necessariamente interdependentes e envolvem diferentes vias de sinalização (HO; SUAREZ, 2001; LUNA et al., 2015).

O padrão de motilidade hiperativada tem sido associado ao aumento da concentração de cálcio no flagelo espermático. Acredita-se que este seja o primeiro segundo mensageiro envolvido na cascata da hiperativação espermática e funcione como chave regulatória (OLSON; FAUCI; SUAREZ, 2011), embora outros fatores como cAMP, bicarbonato e substratos metabólicos estejam descritos como essenciais para o início e manutenção da motilidade hiperativada (HO; SUAREZ, 2001). A entrada de cálcio extracelular, bem como a mobilização de reservas intracelulares são as principais formas de alcance das altas concentrações necessárias para a alteração do padrão cinético espermático. Ainda, ionóforos de cálcio e propriedades farmacológicas como cafeína, procaína e outras, podem atuar como indutores da hiperativação espermática ao passo que facilitam a entrada ou liberação de cálcio (OLSON; FAUCI; SUAREZ, 2011).

Assim como já determinado para outras espécies domésticas, o padrão de movimento do espermatozoide hiperativado avaliado pela análise computadorizada do sêmen (CASA), foi descrito pela primeira vez para a espécie suína por Schmidt e Kamp em 2004. A partir de então, foram propostos valores limites para algumas características de motilidade, capazes de diferenciar espermatozoides em estado de hiperativação dos demais, assim como feito para a avaliação de outras diferentes subpopulações espermáticas pelo CASA (MAREE; VAN DER HORST, 2013). No entanto, uma vez relatada a diferença existente entre resultados obtidos a partir de diferentes sistemas computadorizados (HU et al., 2013; BORYSHPOLETS et al., 2013), diante da forma pela qual características de motilidade são derivadas e compreendidas por cada um dos equipamentos, talvez seja mais adequado e recomendado a caracterização do padrão cinético da população espermática de interesse em cada uma das plataformas disponíveis.

2.7 PLASMA SEMINAL SOBRE A CAPACITAÇÃO E HIPERATIVAÇÃO ESPERMÁTICA

A atuação do plasma seminal sobre a funcionalidade da célula espermática uma vez em contato com ela é algo descrito em diversos trabalhos. Seus variados constituintes parecem atuar sobre diferentes parâmetros celulares, sendo diante disso frequentemente avaliados separadamente. Deste modo, proteínas espermadesinas, principais representantes do conteúdo proteico presente no plasma seminal, são amplamente conhecidas por estabilizar a membrana plasmática espermática uma vez aderida à mesma durante a ejaculação, sendo capazes de modular e regular, entre outros eventos, a capacitação espermática (CABALLERO et al., 2008; GONZÁLEZ-CADAVID et al., 2014).

A ação de proteínas presentes no plasma seminal prevenindo a ocorrência de eventos comuns ao processo de capacitação espermática em suínos (VADNAIS; ROBERTS, 2010) e outras espécies (THÉRIEN; BOUSQUET; MANJUNATH, 2001; BARRIOS et al., 2005) se encontra muito bem descrita. Diante da ação decapacitante exercida por tais proteínas, outro evento relacionado à capacitação parece ser influenciado na presença do plasma seminal. Em estudo conduzido por Schmidt e Kamp (2004), os autores reportaram que fatores decapacitantes, bem como outros fatores presentes no plasma seminal podem estar relacionados à quantidade de cálcio necessária para que a hiperativação espermática aconteça. A necessidade deste importante íon, principal sinalizador das vias de hiperativação (OLSON; FAUCI; SUAREZ, 2011), em níveis muito superiores quando espermatozoides estão sob a presença do plasma seminal, em relação à quando o mesmo está ausente, demonstram que o influxo de cálcio nesta condição pode estar dificultado, entre outras possibilidades, pelo bloqueio de canais de íons quando recobertos pelos fatores decapacitantes.

3 HIPÓTESES

---

3 HIPÓTESES

Com base na literatura consultada, as hipóteses deste trabalho são que a remoção do plasma seminal previamente ao processo de refrigeração do espermatozoide suíno é capaz de antecipar a ocorrência de eventos condizentes com a capacitação espermática, bem como aumentar a porcentagem de células hiperativadas, sob condições de capacitação *in vitro*.

4 OBJETIVOS

---

4 OBJETIVOS

À partir da literatura consultada e hipóteses estabelecidas, o objetivo do presente estudo foi avaliar se a remoção do plasma seminal previamente ao processo de refrigeração do sêmen suíno é capaz de influenciar sobre os eventos de capacitação e hiperativação espermática.

5 MATERIAL E MÉTODOS

---

5 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta sessão estão descritas as metodologias empregadas para a execução do presente trabalho, e que por sua vez, contribuíram para o alcance do objetivo e posicionamento diante das hipóteses, previamente apresentados.

5.1 LOCAL E PERÍODO EXPERIMENTAL

O experimento foi conduzido no Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Análises de citometria de fluxo foram realizadas no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Ambos são membros da Universidade de São Paulo e estão situados no *campus* de Pirassununga, São Paulo. O período experimental estendeu-se de novembro de 2016 até janeiro de 2017.

5.2 ANIMAIS

Foram utilizados neste experimento seis cachacos de linhagem híbrida comercial (LM 6200®; DB Genética Suína, Patos de Minas/MG). Os animais permaneceram sob mesmas condições climáticas, ambientais, nutricionais e sanitárias, alojados nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Suínos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, localizados no *campus* de Pirassununga, São Paulo (Figura 1).

Figura 1 – Cachacos alojados nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Suínos

5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi delineado em blocos generalizados, sendo cada cachaço considerado um bloco. Após a coleta da fração rica do ejaculado, a mesma foi fracionada em duas porções para o subsequente preparo dos tratamentos: tratamento MPS (manutenção do plasma seminal) e 2) tratamento RPS (remoção do plasma seminal). Desta forma, a unidade experimental considerada foi 1/2 do ejaculado. Ambos os tratamentos foram acondicionados à 17 °C pelo período de 72 horas e então, igualmente centrifugados e suspensos em meio capacitante (MC). Feito isso, ambos foram incubados sob condições de capacitação *in vitro*. Amostras foram obtidas e avaliadas 0, 2 e 4 h após incubação, o que justificou a adição de medidas repetidas no tempo como complemento de delineamento. As amostras obtidas foram avaliadas quanto às suas características de motilidade pelo sistema de análise computadorizada do sêmen, bem como quanto à sua funcionalidade pela técnica de citometria de fluxo (Figura 2).

Figura 2 – Esquema experimental representativo

Fonte: (PAVANELI, A.P.P., 2018).

1) Coleta da fração rica do ejaculado. 2) Centrifugação seguida da remoção do plasma seminal (etapa realizada apenas para preparação do tratamento RPS). 3) Diluição da fração rica do ejaculado em BTS para preparo do

tratamento MPS, no qual o plasma seminal oriundo da fração rica do ejaculado foi mantido. 4) Suspensão do *pellet*, obtido após o processo de centrifugação, em BTS para preparo do tratamento RPS, no qual não houve portanto a presença de plasma seminal. 5) Amostras referentes aos tratamentos foram refrigeradas à 17 °C por 72 horas, após respeitado o prévio tempo de bancada (90 min à temperatura ambiente; abrigadas da luz). 6) Amostras foram avaliadas pela análise CASA, logo após concluído o tempo de refrigeração. 7) Centrifugação e descarte de sobrenadante, para remoção de qualquer traço de diluidor (RPS) ou ainda, diluidor e plasma seminal (MPS); seguida da suspensão dos espermatozoides em meio capacitante. 8) Incubação das amostras sob condições capacitantes. 9) Coleta de alíquotas para a realização das análises nos tempos pré-determinados: 0 h (10 min); 2 h e 4 h após incubação.

5.4 COLETA DO SÊMEN E AVALIAÇÕES ESPERMÁTICAS INICIAIS

Foram obtidos quatro ejaculados de cada um dos animais utilizados (n=24). A coleta do sêmen foi realizada através do método da mão enluvada, após conduzida a prévia higienização do prepúcio dos machos (esgotamento e lavagem do divertículo prepucial). Com o auxílio de um papel filtro, preso a borda do copo de coleta, toda a fração gelatinosa do ejaculado suíno pode ser individualizada e descartada. Somente a fração rica (FR) de cada ejaculado foi coletada para a execução do presente estudo, sendo as demais descartadas (Figura 3).

Figura 3 – Coleta da fração rica do ejaculado suíno

Fonte: (PAVANELI, A.P.P., 2018).

A) Coleta de sêmen pelo método da mão enluvada. B) Fração rica do ejaculado (FR).

Após a coleta de cada ejaculado, o mesmo foi submetido às análises computadorizada do sêmen (CASA; Figura 4), através do software Sperm Class Analyzer (SCA®; ver. 5.0; Microptics S.L., Barcelona, Espanha), e microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC; Nikon®, Modelo Eclipse Ni-U 80i) para a avaliação de características de motilidade e morfologia espermática, respectivamente. Além disso, com o auxílio de um hematocítmetro (câmara de Neubauer) foi possível obter a concentração espermática inicial de cada ejaculado. Diante desta prévia avaliação, somente ejaculados com motilidade total > 80%, alterações morfológicas < 20% e concentração espermática > 800×10^6 spz/mL foram considerados aptos ao estudo.

Figura 4 – Motilidade espermática avaliada pela Análise Computadorizada do Sêmen (CASA)

Fonte: (PAVANELI, A.P.P., 2018).

A) Análise das amostras. B) Trajetos em cores diferentes representam distintos padrões de motilidade espermática: Vermelho, espermatozoides apresentando motilidade progressiva rápida. Verde, espermatozoides apresentando motilidade progressiva lenta. Azul, espermatozoides sem motilidade progressiva. Amarelo, espermatozoides imóveis/estáticos.

5.5 PROCESSAMENTO E CONSERVAÇÃO DO SÊMEN SUÍNO REFRIGERADO

Uma vez considerada apta ao estudo, a fração rica do ejaculado foi fracionada em dois tubos Falcon® e diluída em *Beltsville Thawing Solution* (BTS) de acordo com os seguintes tratamentos: 1) tratamento MPS, no qual a presença do plasma seminal foi mantida; e 2) tratamento RPS, no qual a prévia remoção do plasma seminal foi realizada. Para a remoção do plasma seminal, a FR foi primeiramente diluída em BTS na proporção 1:1 (v:v) e submetida a centrifugação ($500 \times g$ / 10 min). Todo o volume restante de sobrenadante (contendo plasma

seminal e BTS) foi aspirado e descartado, sendo na sequência o *pellet* suspenso em BTS. Ambos os tratamentos tiveram seu volume e concentração espermática finais ajustados à 48 mL e 30×10^6 spz/mL, respectivamente, com o auxílio de uma câmara de Neubauer. Após preparados, os mesmos permaneceram na bancada abrigados da luz e sob temperatura ambiente por 90 min. Transcorrido esta etapa, foram acondicionados à 17 °C por 72 horas, sendo homogeneizados duas vezes ao dia durante tal período (Figura 2).

Diante do que já foi abordado previamente por outros autores (LEAL et al., 2018, no prelo), neste estudo não foi considerado necessário o emprego de um terceiro tratamento onde a fração rica seria centrifugada e novamente ressuspensa em seu plasma seminal, a fim de avaliar os efeitos do processo de centrifugação sobre a célula espermática. Os autores citados acima demonstraram em seu trabalho que não há qualquer efeito deletério à qualidade espermática quando esta célula é submetida ao processo de centrifugação ($500 \times g / 10$ min).

5.6 CAPACITAÇÃO *IN VITRO*

Após armazenados sob refrigeração à 17 °C por 72 horas, ambos os tratamentos empregados neste estudo foram submetidos à centrifugação ($500 \times g / 10$ min) e posterior descarte de seus sobrenadantes. Desta forma, diluidor e plasma seminal (tratamento MPS) ou apenas diluidor (tratamento RPS), foram removidos. Os espermatozoides de ambos os tratamentos foram ressuspensos em meio capacitante (MC), mantendo a inicial concentração preconizada, 30×10^6 spz/mL. O meio capacitante utilizado neste estudo foi composto por KCl (4,8 mM), KH_2PO_4 (1,2 mM), NaCl (95 mM), glucose (5,55 mM), NaHCO_3 (25 mM), CaCl_2 (2 mM), BSA (0,4%) e piruvato (2 mM), assim como descrito por Tardif et al. (2001). O pH do meio foi ajustado à 7,4 com o uso de NaOH. Uma vez em MC, os tratamentos foram incubados em estufa úmida (G185 Long Term Flat Bed Incubator®) com temperatura e concentração de CO_2 controlados, mantidos à 38,5 °C e 5%, respectivamente (Figura 2). Alíquotas de ambos os tratamentos foram coletadas nos tempos 0 horas (T0; 10 min após incubação), 2 horas (T2) e 4 horas (T4) pós-incubação para a realização das análises descritas abaixo.

5.7 ANÁLISE COMPUTADORIZADA DO SÊMEN (CASA)

A cada tempo de análise, previamente determinados, amostras foram avaliadas quanto às suas características de motilidade pelo sistema de análise computadorizada do sêmen

(CASA–SCA®), montado sobre o microscópio de epifluorescência (Nikon®, Modelo Eclipse Ni-U 80i) (Figura 4). Primeiramente, as amostras foram diluídas em meio TALP *sperm* (BAVISTER; LEIBFRIED; LIEBERMAN, 1983) - preparado sem cálcio e bicarbonato de sódio - a fim de obter-se a concentração de 20×10^6 spz/mL para a análise das células no sistema. As características de motilidade analisadas foram: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), espermatozoides rápidos (RAP, %), velocidade média de percurso (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade em linha reta (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide (ALH, μm), frequência do batimento flagelar cruzado (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade (LIN, %) e índice de oscilação (WOB, %). As características MT, MP e RAP foram definidas como a porcentagem de espermatozoides que apresentavam valores $VAP > 15 \mu\text{m/s}$, $STR > 45\%$ e $VAP > 45 \mu\text{m/s}$, respectivamente.

5.7.1 População espermática hiperativada

Neste estudo avaliou-se também a porcentagem de espermatozoides hiperativados (HYPER) presente em cada amostra, a fim de determinar uma possível modulação deste evento pela prévia exposição ou não ao plasma seminal. Tal aferição foi realizada durante a avaliação dos espermatozoides pelo sistema CASA, através da ferramenta *Edit/Sort* oferecida pelo *software* SCA®, ajustada com valores obtidos em um prévio experimento conduzido em nosso laboratório (PAVANELI et al., 2017), o qual teve por objetivo determinar e caracterizar por meio do agrupamento de características de motilidade, o padrão cinético de um espermatozoide suíno hiperativado (Apêndice A). Deste modo, as seguintes características e seus respectivos valores limitantes foram considerados para a avaliação da população espermática no presente estudo: $LIN < 41\%$, $STR < 60\%$, $ALH > 3\mu\text{m}$ e $WOB < 54\%$.

5.8 ANÁLISES POR CITOMETRIA DE FLUXO

Análises para avaliação funcional do espermatozoide suíno foram realizadas no citômetro de fluxo BDAccuri C6 (Beckton-Dickeson, San Jose, USA), controlado pelo *software* BDAccuri C6 (Beckton-Dickeson, San Jose, USA). Uma vez coletadas, todas as amostras foram diluídas em meio capacitante (5×10^6 spz/mL), antes de serem incubadas com as sondas fluorescentes de interesse. As condições de incubação sob as quais os espermatozoides permaneceram expostos aos fluorocromos utilizados foram sempre as

mesmas (37 °C / abrigadas da luz). Após incubação, as amostras foram novamente diluídas ($2,5 \times 10^6$ spz/mL), antes de serem analisadas pelo aparelho. As amostras passaram no instrumento com taxa de aquisição de aproximadamente 600-1000 eventos/s, sendo contadas 10.000 células por análise. Células analisadas foram interceptadas simultaneamente por um laser de argônio na faixa de 488 nm e por um laser vermelho na faixa de 640 nm. A emissão da fluorescência das sondas excitadas pelo laser de argônio foram captadas pelos filtros FL1 (Band Pass - 533/30 nm), FL2 (Band Pass - 585/40 nm) e FL3 (Long Pass > 670 nm), já as sondas excitadas pelo laser vermelho, tiveram sua emissão de fluorescência captada pelo filtro FL4 (Band Pass - 675/25 nm).

5.8.1 Exclusão de debris celulares (SYTO-59)

Em todas as análises realizadas por citometria de fluxo neste estudo, amostras foram submetidas à correção para exclusão de debris celulares e quaisquer outras partículas, de mesmo tamanho e granulosidade do espermatozoide, que pudessem superestimá-los (PETRUNKINA et al., 2010). Para isto, espermatozoides suínos foram corados pela sonda SYTO-59 (5 nM, Molecular Probes®), a qual tem alta afinidade pelo DNA, durante a incubação com as demais sondas fluorescentes empregadas em cada uma das análises realizadas.

5.8.2 Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática (PI/YO-PRO-1)

Para avaliação das alterações na permeabilidade da membrana plasmática foram utilizadas as sondas fluorescentes YO-PRO-1 (Molecular Probes®) e Iodeto de Propídio (PI; Sigma-Aldrich®), as quais são capazes de penetrá-la quando esta se encontra inicialmente alterada ou inteiramente lesada, respectivamente (IDZIOREK et al., 1995). Amostras de sêmen foram inicialmente coradas com YO-PRO-1 (25 nM) e incubadas por 10 min. Após transcorrido esta etapa, as sondas PI (1,67 µg/mL) e SYTO-59 (5 nM) foram adicionadas e as amostras incubadas por mais 10 min. Com esta técnica de coloração foi possível identificar três diferentes populações espermáticas: i) espermatozoides viáveis sem qualquer alteração de permeabilidade (PI/YO-PRO-1⁻); ii) espermatozoides viáveis com sinais iniciais de alteração de permeabilidade (PI/YO-PRO-1⁺); e iii) espermatozoides não-viáveis (PI⁺/YO-PRO-1⁺ ou -) (Figura 5).

Figura 5 – Gráficos gerados à partir do software BDAccuri C6 para a análise da permeabilidade de membrana

Fonte: (PAVANELI, A.P.P., 2018).

A) Histograma representativo da pré-seleção de células espermáticas através da mensuração de tamanho e complexidade interna das células. B) Histograma representativo da identificação de células espermáticas, representadas pela população SYTO-59⁺ (SPERM), a partir da população pré-selecionada no histograma A. C) Histograma representativo das populações celulares com membrana plasmática íntegra (LIVE; PI⁻) e lesada (DEAD; PI⁺), à partir da porcentagem de células SYTO-59⁺. D) Histograma representativo das populações celulares com permeabilidade de membrana íntegra (YP⁻) e alterada (YP⁺), à partir da porcentagem de células SYTO-59⁺. E) Dot plot representativo de PI × YO-PRO-1, o qual possibilitou a categorização de três populações espermáticas: Viáveis sem qualquer alteração de permeabilidade (IP⁻/YP⁻; LIVE); Viáveis com sinais iniciais de alteração de permeabilidade (PI⁺/YP⁻; APPOPTOTIC) e não viáveis (PI⁺/YP⁺ ou ⁺; DEAD).

5.8.3 Avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal (PI/FITC-PSA)

Para avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal, foram empregadas as sondas PI e FITC-PSA (Sigma-Aldrich®), respectivamente. Alíquotas de ambos os tratamentos foram incubadas por 10 min em SYTO-59 (5 nM), PI (3,34 µg/mL) e FITC-PSA (0,66 mg/mL). Com o emprego desta técnica foi possível a identificação de quatro populações espermáticas: i) espermatozoides com membranas acrossomal e plasmática íntegras (AIPI); ii) espermatozoides com membranas acrossomal e plasmática lesadas (ALPL); iii) espermatozoides com membrana acrossomal íntegra e plasmática lesada (AIPL);

iv) espermatozoides com membrana acrossomal lesada e plasmática íntegra (ALPI) (CELEGHINI et al., 2007; DE ANDRADE et al., 2007; 2011) (Figura 6).

Figura 6 – Gráficos gerados à partir do software BDAccuri C6 para a análise simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal

Fonte: (PAVANELI, A.P.P., 2018).

A) Histograma representativo da pré-seleção de células espermáticas através da mensuração de tamanho e complexidade interna das células. B) Histograma representativo da identificação de células espermáticas, representadas pela população SYTO-59⁺ (SPERM), a partir da população pré-selecionada no histograma A. C) Histograma representativo das populações celulares com membrana plasmática íntegra (LIVE; PI⁻) e lesada (DEAD; PI⁺), à partir da porcentagem de células SYTO-59⁺. D) Histograma representativo das populações celulares com membrana acrossomal íntegra (FITC-PSA⁻; IA) e lesada (FITC-PSA⁺; DA), à partir da porcentagem de células SYTO-59⁺. E) Dot plot representativo de PI × FITC-PSA, o qual possibilitou a categorização de quatro populações espermáticas: AIPI, espermatozoides com membranas acrossomal e plasmática íntegras (IP⁻/FITC-PSA⁻; IPIA); ALPL, espermatozoides com membranas acrossomal e plasmática lesadas (IP⁺/FITC-PSA⁺; DPDA); AIPL, espermatozoides com membrana acrossomal íntegra e plasmática lesada (IP⁺/FITC-PSA⁻; DPIA) e ALPI, espermatozoides com membrana acrossomal lesada e plasmática íntegra (IP⁻/FITC-PSA⁺; IPDA), à partir da porcentagem de células SYTO-59⁺.

5.8.4 Avaliação da desordem lipídica em membrana plasmática (YO-PRO-1/M540)

Para avaliação da desordem lipídica em membrana plasmática foram empregadas as sondas fluorescentes Merocianina 540 (M540; Molecular Probes®) e YO-PRO-1 (HARRISON; ASHWORTH; MILLER, 1996) (Figura 7). Primeiramente, amostras de sêmen

foram coradas com YO-PRO-1 (50 nM) e SYTO-59 (5 nM) e incubadas por 10 min. Transcorrida esta etapa, as amostras receberam a adição da sonda M540 (16,2 μ M) e foram incubadas por mais 70 s (FLESCHE et al., 1999; RATHI et al., 2001). Células viáveis (YO-PRO-1⁻) e coradas pela sonda M540 foram analisadas quanto à mediana da intensidade de fluorescência, captada pelo filtro FL2.

Figura 7 – Gráficos gerados à partir do software BD Accuri C6 para a análise da desordem lipídica na membrana plasmática

Fonte: (PAVANELI, A.P.P., 2018).

A) Histograma representativo da pré-seleção de células espermáticas através da mensuração de tamanho e complexidade interna das células. B) Histograma representativo da identificação de células espermáticas, representadas pela população SYTO-59⁺ (SPERM), a partir da população pré-selecionada no histograma A. C) Histograma representativo da população celular viável (YO-PRO-1⁻; LIVE) à partir da porcentagem de células SYTO-59⁺. D) Histograma representativo da população de células viáveis apresentando desordem lipídica (M540⁺) à partir do qual foi obtida a mediana da intensidade de fluorescência (MIF).

5.8.5 Avaliação da translocação do fosfolípido fosfatidilserina na membrana plasmática (PI/Annexin V-FITC)

A translocação do fosfolípido fosfatidilserina, do folheto interno para o folheto externo da membrana plasmática, pode ser identificada através do emprego da sonda fluorescente Annexin V-FITC (Molecular Probes®) (PEÑA et al., 2005; VADNAIS; ALTHOUSE, 2011)

(Figura 8). A sonda fluorescente PI foi juntamente empregada para avaliação de células quanto à sua integridade de membrana plasmática. Primeiramente, amostras de sêmen foram coradas pela sonda Annexin V-FITC de acordo com as instruções do fabricante, e incubadas por 5 min. Então, as sondas PI (3,34 $\mu\text{g/mL}$) e SYTO-59 (5 nM) foram adicionadas e as amostras incubadas por mais 10 min. Células viáveis (PI⁻) e coradas pela sonda Annexin V-FITC foram analisadas quanto à mediana da intensidade de fluorescência, captada pelo filtro FL1.

Figura 8 – Gráficos gerados à partir do *software* BDAccuri C6 para a análise da translocação da fosfatidilserina na membrana plasmática

Fonte: (PAVANELI, A.P.P., 2018).

A) Histograma representativo da pré-seleção de células espermáticas através da mensuração de tamanho e complexidade interna das células. B) Histograma representativo da identificação de células espermáticas, representadas pela população SYTO-59⁺ (SPERM), a partir da população pré-selecionada no histograma A. C) Histograma representativo da população celular apresentando membrana plasmática íntegra (PI⁻; LIVE) à partir da porcentagem de células SYTO-59⁺. D) Histograma representativo da população de células com membrana plasmática íntegra apresentando translocação do fosfolípídio fosfatidilserina (PI/Annexin V-FITC⁺; TRANSLOCATED), à partir do qual foi obtida a mediana da intensidade de fluorescência (MIF).

5.8.6 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PI/JC-1)

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial do espermatozoide suíno pode ser realizada através do emprego da sonda fluorescente JC-1 (Molecular Probes®; Figura 9). Sua

cor é alterada de verde (formação de monômeros) para laranja ou vermelho (formação de J-agregados), em virtude do aumento do potencial de membrana. A sonda PI foi mais uma vez utilizada para avaliação de espermatozoides como viáveis ou não. Amostras de sêmen foram simultaneamente coradas pelas sondas JC-1 (1,02 μ M), PI (3,34 μ g/mL) e SYTO-59 (5 nM), e incubadas por 10 min. Com o emprego desta técnica puderam ser identificadas duas populações espermáticas de interesse: i) espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial e ii) espermatozoides com baixo potencial de membrana mitocondrial (DE ANDRADE et al., 2011).

Figura 9 – Gráficos gerados à partir do *software* BDAccuri C6 para a análise do potencial de membrana mitocondrial (PMM)

Fonte: (PAVANELI, A.P.P., 2018).

A) Histograma representativo da pré-seleção de células espermáticas através da mensuração de tamanho e complexidade interna das células. B) Histograma representativo da identificação de células espermáticas, representadas pela população SYTO-59⁺ (SPERM), a partir da população pré-selecionada no histograma A. C) Histograma representativo da população celular apresentando membrana plasmática íntegra (PI⁺; LIVE) à partir da porcentagem de células SYTO-59⁺. D) Histograma representativo da população de células SYTO-59⁺ apresentando alto potencial de membrana mitocondrial (JC-1⁺; HIGH MMP). E) Dot plot representativo de PI × JC-1, o qual possibilitou a categorização de três populações espermáticas: i) espermatozoides viáveis com baixo potencial de membrana mitocondrial (LIVE LOW MMP; PI⁺/JC1⁻); ii) espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial (LIVE HIGH MMP; PI⁺/JC1⁺); iii) espermatozoides inviáveis (DEAD; PI⁺).

5.8.7 Avaliação do estresse oxidativo citoplasmático (YO-PRO-1/DHE)

O estresse oxidativo citoplasmático foi avaliado neste estudo através da mensuração da produção intracelular de ânion superóxido (O_2^-), possibilitada pelo uso da sonda fluorescente DHE (Molecular Probes®; Figura 10) (RICE et al., 2003). Amostras de sêmen foram coradas pela sonda DHE (2,4 μ M) por 30 min. As sondas YO-PRO-1 (50 nM) e SYTO-59 (5 nM) foram adicionadas 10 e 20 min após o iniciada a incubação em DHE, respectivamente. Células viáveis (YO-PRO-1⁻) e coradas pela sonda DHE foram analisadas quanto à mediana de intensidade de fluorescência, captada pelo filtro FL3.

Figura 10 – Gráficos gerados à partir do *software* BD Accuri C6 para a análise do estresse oxidativo citoplasmático

Fonte: (PAVANELI, A.P.P., 2018).

A) Histograma representativo da pré-seleção de células espermáticas através da mensuração de tamanho e complexidade interna das células. B) Histograma representativo da identificação de células espermáticas, representadas pela população SYTO-59⁺ (SPERM), a partir da população pré-selecionada no histograma A. C) Histograma representativo da população celular viável (YO-PRO-1⁻; LIVE) à partir da porcentagem de células SYTO-59⁺. D) Histograma representativo da população de células viáveis apresentando estresse oxidativo citoplasmático (YO-PRO-1/DHE⁺; V1-R), à partir do qual foi obtida a mediana da intensidade de fluorescência (MIF).

5.8.8 Avaliação da peroxidação lipídica em membrana plasmática (PI/C11-BODIPY^{581/591})

A avaliação da peroxidação lipídica em membrana plasmática foi possibilitada através do uso da sonda fluorescente C11-BODIPY^{581/591} (Molecular Probes®), a qual se incorpora na membrana plasmática e tem sua fluorescência alterada de vermelha para verde quando oxidada (NEILD et al., 2005) (Figura 11). Amostras de sêmen foram primeiramente coradas com a sonda C11-BODIPY^{581/591} (6,6 µg/mL) à 37 °C por 20 min. Na sequência, as sondas PI (3,34 µg/mL) e SYTO-59 (5 nM) foram adicionadas e as amostras mais uma vez incubadas por 10 min. Células viáveis (PI-) e coradas pela sonda C11-BODIPY^{581/591} foram analisadas quanto à mediana da intensidade de fluorescência, captada pelo filtro FL1.

Figura 11 – Gráficos gerados à partir do *software* BDAccuri C6 para a análise da peroxidação lipídica da membrana plasmática

Fonte: (PAVANELI, A.P.P., 2018).

A) Histograma representativo da pré-seleção de células espermáticas através da mensuração de tamanho e complexidade interna das células. B) Histograma representativo da identificação de células espermáticas, representadas pela população SYTO-59⁺ (SPERM), a partir da população pré-selecionada no histograma A. C) Histograma representativo da população celular apresentando membrana plasmática íntegra (PI-; LIVE) à partir da porcentagem de células SYTO-59⁺. D) Histograma representativo da população de células viáveis apresentando peroxidação lipídica de membrana (PI/BP⁺), à partir do qual foi obtida a mediana da intensidade de fluorescência (MIF).

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas empregadas neste estudo foram conduzidas no software SAS (versão 9.3; Institute Inc., Cary, NC, USA). Dados obtidos foram analisados com prévia verificação da normalidade dos resíduos e homogeneidade de variância pelos testes Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. As variáveis dependentes que não atenderam às premissas estatísticas foram submetidas à raiz quadrada do arco-seno ou transformação logarítmica $[(\text{Log}/x+1)]$. Os dados originais ou transformados foram submetidos à análise de variância (PROC MIXED). Quando o principal efeito foi significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey-Kramer. Foi considerado o nível de 5 % de significância. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

6 RESULTADOS

---

6 RESULTADOS

6.1 MOTILIDADE ESPERMÁTICA

Resultados obtidos à partir da avaliação de espermatozoides refrigerados por 72 horas, através da análise computadorizada do sêmen, estão descritos na Tabela 1. Não foi observado qualquer efeito do plasma seminal ($P > 0,05$) sobre as características de motilidade total e progressiva dos espermatozoides.

Resultados para características de motilidade total e progressiva, bem como a quantificação da população hiperativada em amostras avaliadas após incubação em condições capacitantes estão apresentados na Tabela 2. Para ambos os tratamentos, as motilidades espermáticas avaliadas foram reduzidas ao longo do tempo de incubação ($P < 0,05$). Entretanto, nenhum efeito do plasma seminal sobre estas características foi observado ao longo do tempo. Ainda, a porcentagem de células espermáticas hiperativadas não sofreu qualquer efeito do plasma seminal. Para todas as demais características de motilidade avaliadas neste estudo observou-se efeito do tempo de incubação ($P < 0,05$), dentre os quais o parâmetro BCF apresentou interação entre os fatores tempo e tratamento ($P < 0,05$), representando valor menor para o tratamento RPS após 4 horas de incubação. A remoção prévia do plasma seminal não influenciou sob os demais parâmetros avaliados (Tabela 10; Apêndice B).

Tabela 1 – Características de motilidade apresentadas por espermatozoides suínos refrigerados por 72 horas, na presença (MPS) ou não (RPS) do plasma seminal

Características de motilidade	MPS	RPS
MT (%)	75,52 ± 2,39 ^a	71,67 ± 2,33 ^a
MP (%)	61,90 ± 2,46 ^a	57,06 ± 2,73 ^a

Fonte: (PAVANELI, A.P.P., 2018).

MT, motilidade total; MP, motilidade progressiva; MPS, manutenção do plasma seminal; RPS, remoção do plasma seminal. Letras iguais sobrescritas indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$).

Tabela 2 – Características de motilidade apresentadas por espermatozoides suínos submetidos à capacitação in vitro, após terem sido refrigerados na presença (MPS) ou não do plasma seminal (RPS)

Características de motilidade	Tempo (h)	MPS	RPS	Média ¹
MT (%)	0	71,45 ± 2,11	68,38 ± 1,71	69,88 ± 1,35 ^A
	2	42,74 ± 3,41	42,86 ± 2,88	42,80 ± 2,22 ^B
	4	39,48 ± 3,15	37,94 ± 2,79	38,71 ± 2,10 ^C
	Média ²	50,73 ± 2,12 ^a	49,50 ± 1,86 ^a	
MP (%)	0	57,01 ± 2,40	54,34 ± 2,07	55,69 ± 1,59 ^A
	2	33,08 ± 3,15	32,16 ± 2,65	32,61 ± 2,04 ^B
	4	28,92 ± 2,96	27,61 ± 2,61	28,26 ± 1,96 ^C
	Média ²	39,59 ± 1,96 ^a	37,79 ± 1,74 ^a	
*HYPER (%)	0	1,31 ± 0,18	1,36 ± 0,16	1,34 ± 0,12 ^A
	2	0,75 ± 0,12	0,88 ± 0,14	0,81 ± 0,09 ^B
	4	0,81 ± 0,12	0,63 ± 0,11	0,72 ± 0,08 ^B
	Média ²	0,96 ± 0,08 ^a	0,95 ± 0,08 ^a	

Fonte: (PAVANELI, A.P.P., 2018).

Média¹, médias de tempo; Média², médias de tratamento; MP, motilidade progressiva; MPS, manutenção do plasma seminal; MT, motilidade total; RPS, remoção do plasma seminal; HYPER, espermatozoides hiperativados. *População identificada à partir de valores previamente determinados para a caracterização do espermatozoide suíno hiperativado (Apêndice A). Diferentes letras minúsculas sobrescritas indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$). Diferentes letras maiúsculas sobrescritas indicam diferenças significativas entre os tempos ($P < 0,05$).

6.2 CITOMETRIA DE FLUXO

6.2.1 Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática

Resultados obtidos à partir da análise de permeabilidade da membrana plasmática estão descritos na Tabela 3. A porcentagem de células espermáticas viáveis sem qualquer alteração em sua permeabilidade (PI⁻/YO-PRO-1⁻) foi reduzida depois de 2 horas sob condições capacitantes ($P < 0,05$), ao passo que a porcentagem de células viáveis com sinais iniciais de alteração de permeabilidade (PI⁻/YO-PRO-1⁺) e de células não viáveis (PI⁺/YO-PRO-1⁻ or ⁺) aumentaram ($P < 0,05$). A prévia remoção do plasma seminal não mostrou qualquer influência sobre este parâmetro analisado ($P > 0,05$).

Tabela 3 – Avaliação da permeabilidade de membrana em espermatozoides suínos submetidos à capacitação in vitro, após terem sido refrigerados na presença (MPS) ou não do plasma seminal (RPS)

Categoria celular	Tempo (h)	MPS	RPS	Média ¹
Viáveis (% YO-PRO ⁻ /IP ⁻)	0	54,03 ± 2,20	50,62 ± 2,26	52,33 ± 1,58 ^A
	2	34,66 ± 1,79	34,65 ± 1,82	34,65 ± 1,27 ^B
	4	33,65 ± 1,63	32,91 ± 1,63	33,28 ± 1,15 ^B
	Média ²	40,78 ± 1,34 ^a	39,39 ± 1,29 ^a	
Alterações iniciais em PM (% YO-PRO ⁺ /IP ⁻)	0	10,67 ± 0,98	13,30 ± 1,41	11,98 ± 0,86 ^B
	2	16,42 ± 1,81	18,23 ± 2,03	17,33 ± 1,37 ^A
	4	16,66 ± 1,92	18,36 ± 1,89	17,51 ± 1,34 ^A
	Média ²	14,58 ± 0,96 ^a	16,63 ± 1,05 ^a	
Não viáveis (% YO-PRO-1 ⁻ ou ⁺ /IP ⁺)	0	30,47 ± 2,08	31,18 ± 2,20	30,82 ± 1,51 ^B
	2	46,15 ± 1,88	44,16 ± 1,74	45,17 ± 1,28 ^A
	4	46,92 ± 1,88	46,63 ± 1,75	46,77 ± 1,28 ^A
	Média ²	41,02 ± 1,30 ^a	40,49 ± 1,25 ^a	

Fonte: (PAVANELI, A.P.P., 2018).

Média¹, médias de tempo; Média², médias de tratamento; MPS, manutenção do plasma seminal; PM, permeabilidade de membrana; RPS, remoção do plasma seminal. Diferentes letras minúsculas sobrescritas indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$). Diferentes letras maiúsculas sobrescritas indicam diferenças significativas entre os tempos ($P < 0,05$).

6.2.2 Avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal

A partir da técnica empregada para avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal, quatro populações espermáticas puderam ser identificadas e estão descritas na Tabela 4, juntamente com os resultados obtidos. Nenhuma diferença entre os tratamentos foi observada quanto a porcentagem de espermatozoides com membranas acrossomal e plasmática íntegras (AIPI), sendo esta população reduzida ao longo do tempo de incubação ($P < 0,05$). Já a porcentagem de espermatozoides com membrana acrossomal íntegra e plasmática lesada (AIPL) foi menor ($P < 0,05$) em amostras refrigeradas na presença do plasma seminal, ao contrário do observado para a população de espermatozoides com membrana acrossomal lesada e plasmática íntegra (ALPI) sob mesmo tratamento. A porcentagem de células AIPL aumentou ($P < 0,05$) ao longo do tempo de incubação, enquanto a de ALPI manteve-se estável.

Tabela 4 – Avaliação simultânea da integridade de membranas plasmática e acrossomal em espermatozoides suínos submetidos à capacitação in vitro, após terem sido refrigerados na presença (MPS) ou não do plasma seminal (RPS)

Categoria celular	Tempo (h)	MPS	RPS	Média ¹
AIIPI (%)	0	41,66 ± 2,53	40,53 ± 2,39	41,10 ± 1,73 ^A
	2	25,70 ± 1,73	30,02 ± 2,04	27,86 ± 1,35 ^B
	4	25,00 ± 2,13	26,52 ± 1,78	25,76 ± 1,38 ^B
	Média ²	30,78 ± 1,40 ^a	32,36 ± 1,30 ^a	
AIIPL (%)	0	9,61 ± 1,32	14,30 ± 1,61	11,98 ± 1,07 ^B
	2	14,03 ± 1,65	17,32 ± 1,46	15,67 ± 1,11 ^A
	4	12,41 ± 1,54	16,23 ± 1,56	14,34 ± 1,11 ^A
	Média ²	12,03 ± 0,88 ^b	15,95 ± 0,89 ^a	
ALPI (%)	0	16,15 ± 1,28	13,45 ± 1,52	14,80 ± 1,00 ^a
	2	15,92 ± 1,21	11,08 ± 1,01	13,50 ± 0,82 ^a
	4	17,07 ± 1,34	14,08 ± 1,34	15,57 ± 0,95 ^a
	Média ²	16,38 ± 0,73 ^a	12,87 ± 0,76 ^b	
ALPL (%)	0	31,92 ± 2,13	31,72 ± 2,25	31,82 ± 1,54 ^b
	2	44,36 ± 1,70	41,58 ± 1,88	42,97 ± 1,27 ^a
	4	44,82 ± 2,01	43,17 ± 1,75	44,00 ± 1,33 ^a
	Média ²	40,37 ± 1,23 ^a	38,82 ± 1,21 ^a	

Fonte: (PAVANELL, A.P.P., 2018).

AIIPI, espermatozoides com membranas acrossomal e plasmática íntegras; AIIPL, porcentagem de espermatozoides com membrana acrossomal íntegra e plasmática lesada; ALPI, espermatozoides com membrana acrossomal lesada e plasmática íntegra; ALPL espermatozoides com membranas acrossomal e plasmática lesadas; Média¹, médias de tempo; Média², médias de tratamento; MPS, manutenção do plasma seminal; RPS, remoção do plasma seminal. Diferentes letras minúsculas sobrescritas indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$). Diferentes letras maiúsculas sobrescritas indicam diferenças significativas entre os tempos ($P < 0,05$).

6.2.3 Avaliação da desordem lipídica e translocação do fosfolípido fosfatidilserina na membrana plasmática

Resultados obtidos à partir das análises de desordem lipídica e translocação da fosfatidilserina estão representados na Tabela 5. A remoção do plasma seminal previamente à refrigeração dos espermatozoides suínos (RPS) não influenciou sob tais parâmetros ($P > 0,05$) durante a posterior submissão destas células à condições capacitantes. Ambos os parâmetros avaliados estiveram mais expressos em função do tempo ($P < 0,05$).

Tabela 5 – Avaliação da desordem lipídica e translocação da fosfatidilserina em membrana plasmática de espermatozoides suínos submetidos à capacitação in vitro, após terem sido refrigerados na presença (MPS) ou não do plasma seminal (RPS)

Análise	Tempo (h)	MPS	RPS	Média ¹
Desordem Lipídica M540 (MIF)	0	7482,86 ± 484,72	7815,93 ± 488,71	7647,52 ± 342,65 ^B
	2	20444,08 ± 3733,23	20364,41 ± 3682,08	20404,69 ± 2607,41 ^A
	4	17172,17 ± 3076,77	18000,99 ± 3073,72	17577,37 ± 2163,31 ^A
	Média ²	15048,76 ± 1678,87 ^a	15393,78 ± 1664,20 ^a	
Translocação FS Annexin V-FITC (MIF)	0	2390,71 ± 207,20	2515,94 ± 238,50	2450,43 ± 156,07 ^B
	4	3887,54 ± 396,21	3048,05 ± 308,79	3474,06 ± 255,48 ^A
	Média ²	3139,13 ± 239,98 ^a	2790,30 ± 198,03 ^a	

Fonte: (PAVANELI, A.P.P., 2018).

Média¹, médias de tempo; Média², médias de tratamento; MIF, mediana da intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias); MPS, manutenção do plasma seminal; FS, fosfatidilserina; RPS, remoção do plasma seminal. Diferentes letras minúsculas sobrescritas indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$). Diferentes letras maiúsculas sobrescritas indicam diferenças significativas entre os tempos ($P < 0,05$).

6.2.4 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PMM)

Resultados obtidos à partir da avaliação do potencial de membrana mitocondrial estão descritos na Tabela 6. Não foi observado qualquer efeito da retirada do plasma seminal previamente a refrigeração dos espermatozoides suínos sobre a porcentagem de células apresentando alto PMM ao longo do tempo ($P > 0,05$).

Tabela 6 – Porcentagem de espermatozoides viáveis apresentando alto potencial de membrana mitocondrial (PMM) quando submetidos à capacitação in vitro, após terem sido refrigerados na presença (MPS) ou não do plasma seminal (RPS)

Categoria celular	Tempo (h)	MPS	RPS	Média ¹
Viáveis com alto PMM (% PI/JC-1 ⁺)	0	52,86 ± 2,38	47,87 ± 2,26	50,37 ± 1,65 ^A
	2	32,95 ± 1,46	34,99 ± 1,47	34,00 ± 1,04 ^B
	4	35,70 ± 1,80	35,86 ± 1,85	35,78 ± 1,28 ^B
	Média ²	40,67 ± 1,34 ^a	39,57 ± 1,19 ^a	

Fonte: (PAVANELI, A.P.P., 2018).

Média¹, médias de tempo; Média², médias de tratamento; MPS, manutenção do plasma seminal; PMM, potencial de membrana mitocondrial; RPS, remoção do plasma seminal. Diferentes letras minúsculas sobrescritas indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$). Diferentes letras maiúsculas sobrescritas indicam diferenças significativas entre os tempos ($P < 0,05$).

6.2.5 Avaliação do estresse oxidativo citoplasmático e peroxidação lipídica da membrana

Resultados obtidos à partir das análises de estresse oxidativo citoplasmático e peroxidação lipídica da membrana plasmática estão descritos na Tabela 7. Tais parâmetros não foram influenciados pela prévia remoção do plasma seminal (RPS) ($P > 0,05$). Os níveis de estresse oxidativo citoplasmático mantiveram-se estáveis ao longo do tempo de incubação, enquanto àqueles representativos da ocorrência de peroxidação lipídica aumentaram ($P < 0,05$).

Tabela 7– Avaliação do estresse oxidativo citoplasmático e peroxidação de membrana em espermatozoides suínos submetidos à capacitação in vitro, após terem sido refrigerados na presença (MPS) ou não do plasma seminal (RPS)

Análise	Tempo (h)	MPS	RPS	Média ¹
Peroxidação lipídica Bodipy (MIF)	0	4353,84 ± 393,15	4330,60 ± 396,35	4342,09 ± 277,59 ^B
	2	4391,04 ± 358,60	3825,72 ± 295,90	4111,49 ± 233,57 ^B
	4	5227,77 ± 472,00	4626,53 ± 365,63	4940,51 ± 302,14 ^A
	Média ²	4666,15 ± 238,84 ^a	4255,45 ± 205,35 ^a	
Estresse oxidativo citoplasmático DHE (MIF)	0	7306,02 ± 469,28	8672,49 ± 652,60	7948,10 ± 399,53 ^A
	2	6150,87 ± 724,93	7174,83 ± 712,75	6686,66 ± 508,51 ^A
	4	7686,90 ± 722,05	7402,08 ± 758,23	7547,66 ± 520,34 ^A
	Média ²	7078,23 ± 376,37 ^a	7709,27 ± 413,39 ^a	

Fonte: (PAVANELI, A.P.P., 2018).

Média¹, médias de tempo; Média², médias de tratamento; MIF, mediana da intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias); MPS, manutenção do plasma seminal; RPS, remoção do plasma seminal. Diferentes letras minúsculas sobrescritas indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$). Diferentes letras maiúsculas sobrescritas indicam diferenças significativas entre os tempos ($P < 0,05$).

7 DISCUSSÃO

---

7 DISCUSSÃO

Além da conhecida atuação do plasma seminal *in vivo* corroborando para o sucesso da fertilização, estudos relatando alterações na qualidade espermática *in vitro* diante de sua presença demonstram que o mesmo é também capaz de modular a funcionalidade do espermatozoide (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2009). Algumas proteínas presentes no plasma seminal, as quais possuem entre outras funções a estabilização da membrana plasmática (DOSTÁLOVA et al., 1994), são capazes de prevenir alterações semelhantes à capacitação induzidas por baixas temperaturas ou condições capacitantes *in vitro* (VADNAIS; ROBERTS, 2010). Com base nesse efeito estabilizador, além de outras possíveis atuações do plasma seminal sobre a célula espermática, nossa hipótese foi que uma vez removido previamente à refrigeração de doses inseminantes, espermatozoides refrigerados responderiam mais prontamente às condições capacitantes *in vitro*, tornando-se capacitados e hiperativados anteriormente à aqueles que estiveram em contato com o plasma seminal durante mesmo processo. Desta forma, uma vez mimetizado o trato reprodutivo da fêmea através da capacitação *in vitro*, torna-se possível observar se o plasma seminal é capaz de modular a ocorrência destes eventos e a partir disso, pressupor qual seria a vida útil destes espermatozoides na tuba uterina, uma vez que poderiam tornar-se precocemente aptos ao processo irreversível de reação acrossomal.

Parâmetros de permeabilidade, desordem lipídica e translocação de fosfolipídio em membrana plasmática de espermatozoides previamente refrigerados, sob a presença ou não do plasma seminal, renderam interessante resultado neste estudo. Espermatozoides de ambos os grupos (MPS e RPS) foram capazes de responder às condições de capacitação *in vitro* de forma igualitária ao longo de todo o tempo que permaneceram incubados, o que nos permite inferir que a ausência do plasma seminal e possíveis proteínas estabilizadoras de membrana (DOSTÁLOVA et al., 1994; VADNAIS; ROBERTS, 2010) durante a refrigeração do espermatozoide suíno não interferem sobre a posterior capacitação espermática destas células. Desta forma, nossos resultados confirmam o que foi relatado por Vadnais & Roberts (2010) previamente, que o efeito decapitante exercido por proteínas presentes no plasma seminal é algo reversível, ou seja, uma vez que tais componentes deixam a célula espermática e estas são submetidas à capacitação *in vitro*, estão aptas à responder de forma adequada à este estímulo.

Quando avaliada a população espermática hiperativada, nossos resultados mostram que uma pequena porcentagem da mesma pode ser observada em ambos os grupos estudados ao longo do tempo de incubação. Isso vai de encontro ao demonstrado em estudos realizados com espermatozoides de outras espécies mamíferas, como a ovina (COLÁS; CEBRIÁN-PÉREZ; MUIÑO-BLANCO, 2010; LUNA et al., 2015), bovina (MARQUEZ; SUAREZ, 2004), equina (MC PARTLIN et al., 2009) e humana (BAJPAI; DONCEL, 2003), demonstrando que sob condições de capacitação *in vitro*, células espermáticas podem se tornar capacitadas sem apresentar qualquer alteração no seu padrão de motilidade, característico de hiperativação. Desta maneira, uma vez que a porcentagem de células hiperativadas foi mínima para ambos os grupos abordados, nosso trabalho mostra que a prévia remoção do plasma seminal e portanto, a privação de contato entre espermatozoide e fatores decapacitantes durante o armazenamento, não foi capaz de alterar a forma como as células responderam às condições oferecidas quanto à mudança do seu padrão de movimento.

Além das avaliações empregadas para responder as principais questões levantadas neste estudo, o mesmo buscou abordar também outros importantes parâmetros relacionados à qualidade seminal, os quais estão diretamente relacionados à habilidade ou não destes espermatozoides tornarem-se capacitados, hiperativados e aptos à reação acrossomal. À partir disso, parâmetros de motilidade, estresse oxidativo, integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e peroxidação lipídica de membrana, foram avaliados.

Neste estudo não foi possível identificar a benéfica atuação do plasma seminal sobre a motilidade espermática, como descrito previamente (CHUTIA et al., 2014; LEAL et al., 2018, no prelo). Espermatozoides de ambos os grupos (MPS e RPS) apresentaram características de motilidade semelhantes quando avaliados antes de serem submetidos à capacitação *in vitro*, ou mesmo durante este período. No entanto, os valores encontrados foram satisfatórios e condizentes com os eventos observados, o que sugere que a ausência do plasma seminal durante a refrigeração (72 h) não seja prejudicial à manutenção da motilidade espermática após este período e durante a subsequente capacitação *in vitro*. Além disso, uma vez tendo sido atribuída a atuação benéfica do plasma seminal sobre parâmetros de motilidade à específicas proteínas, PSP-I/PSP-II (CENTURION et al., 2003; GARCIA et al., 2006), nosso estudo sugere que tais proteínas na presença dos demais constituintes do plasma seminal podem ter sua atuação atenuada ou mesmo prejudicada. Isto porque, autores demonstraram que a associação das proteínas PSP-I/PSP-II com as demais espermadesinas, AQN-1/AQN-3 e AWN, foi prejudicial à motilidade espermática (CENTURION et al., 2003), apesar de serem

descritas como benéficas à estabilização da membrana plasmática, por exemplo (DOSTÁLOVA et al., 1994).

O presente estudo também avaliou os efeitos da remoção do plasma seminal previamente ao armazenamento sobre a posterior integridade da membrana acrossomal dos espermatozoides, considerada essencial para o sucesso da fertilização (FLESCH; GADELLA, 2000). Nosso trabalho mostrou que a porcentagem de espermatozoides com membrana acrossomal lesada e plasmática íntegra (ALPI) foi menor em células armazenadas na ausência do plasma seminal, o que nos permite inferir que a remoção do mesmo previamente à estocagem do sêmen suíno não seja prejudicial e possa ainda funcionar de forma benéfica sobre a preservação da integridade acrossomal. Ainda, embora a diferença em números pareça apenas simbólica (3,5%), devemos levar em conta a concentração espermática com a qual trabalhamos neste estudo associando-a à realidade de campo, como doses inseminantes. Com uma conta rápida, trabalhando com uma concentração final total de $1,5 \times 10^9$ spz, o armazenamento de doses inseminantes na presença do plasma seminal acarretaria na perda de 52,5 milhões de células espermáticas, as quais uma vez com o acrossoma lesado estariam desprovidas da habilidade de fertilização. Considerando que a redução no volume e concentração espermática de doses inseminantes é uma prática que já vem sendo implementada em alguns programas de IA (BORTOLOZZO et al., 2015), a fim de entre outros benefícios, aproveitar melhor o uso de reprodutores de alta genética, é notória que tal perda possa ser significativa à performance reprodutiva *in vivo*.

Assim como já suposto por alguns autores em estudos com sêmen bovino e equino, a concentração de determinados constituintes do plasma seminal, bem como o tempo pelo qual a célula espermática permanece exposta à estes (BERGERON; MANJUNATH, 2006; MOORE; SQUIRES; GRAHAM, 2005), poderiam explicar o efeito deletério exercido pelo plasma seminal sobre a integridade acrossomal neste estudo. Apesar disso, as condições capacitantes oferecidas às células espermáticas em nosso estudo não foram suficientes para avaliar se o plasma seminal é capaz de influenciar sobre a resposta de espermatozoides frente à reação acrossomal, outro importante evento prévio à fertilização. Para isso, o emprego de protocolos compreendendo a indução da reação acrossomal *in vitro*, como relatada por outros autores (YESTE et al., 2015), certamente poderia agregar maiores informações ao nosso estudo, respondendo esta outra questão.

Espécies reativas de oxigênio (EROs) estão intimamente relacionadas ao alcance da capacitação espermática e subsequentes eventos relacionados à fertilização (DE LAMIRANDE et al., 1997). Diante do aumento de sua produção durante estes eventos e

considerando a maior susceptibilidade da membrana plasmática do espermatozoide suíno frente à atuação das EROs (BROUWERS; SILVA; GADELLA, 2005), o presente estudo sugeriu que espermatozoides privados do contato com propriedades antioxidantes presentes no plasma seminal estariam mais expostos ao estresse oxidativo após seu armazenamento, o que culminaria com a lipoperoxidação de suas membranas. Entretanto, nossos resultados mostraram que a prévia remoção do plasma seminal e de possíveis compostos antioxidantes presentes em sua composição (GUTHRIE; WELCH, 2012; BROMFIELD, 2014; BARRANCO et al., 2015), não foi capaz de agravar a produção de EROS e tampouco a peroxidação lipídica da membrana plasmática de espermatozoides armazenados sob esta condição. Ainda, considera-se importante ressaltar que o presente estudo foi conduzido durante meses quentes de verão, fato que pode alterar a concentração e atividade de determinadas enzimas antioxidantes, visto a participação do fator sazonalidade sobre tais (KOZIOROWKA-GILUN et al., 2011).

Estrutura principalmente associada à produção de ATP em células eucariontes e manutenção do metabolismo celular, sabe-se que muitas outras importantes funções tem sido atribuídas à mitocôndria celular, entre elas a produção de EROs e possível reserva intracelular de cálcio (AMARAL et al., 2013). Desta forma, a atividade desta estrutura, podendo ser mensurada quanto ao potencial de membrana que apresenta, pode ser indicativo de como estão ocorrendo processos de capacitação e demais eventos prévios à fertilização, como demonstrado por Ramió-Lluch et al. (2011). Um alto pico no consumo de O₂ pode ser observado pelos autores durante a capacitação espermática e especialmente em resposta à indução da reação acrossomal *in vitro*. Além disso, outros parâmetros como a motilidade (GALLON et al., 2006; PAOLI et al., 2011; WANG et al., 2012) e capacidade fertilizante de espermatozoides (SOUSA et al., 2011) tem sido relacionados ao desempenho mitocondrial. Em nosso trabalho, ao contrário do observado por Yeste et al. (2015), a porcentagem de células viáveis com alto potencial de membrana mitocondrial diminuiu com o passar do tempo de incubação. No entanto, diferentemente do estudo conduzido por estes autores onde utilizou-se sêmen fresco para a avaliação da capacitação *in vitro*, neste estudo avaliamos amostras refrigeradas por 72 h, condição que possivelmente leva à uma menor atividade mitocondrial. Entretanto, este foi mais um parâmetro sobre o qual a prévia exposição ao plasma seminal não pareceu exercer qualquer efeito protetor previamente relatado (CENTURION et al, 2003; GARCIA et al., 2006).

8 CONCLUSÕES

---

8 CONCLUSÕES

Contrariando nossas hipóteses, a remoção do plasma seminal previamente ao processo de refrigeração do sêmen suíno não foi capaz de antecipar a ocorrência de eventos condizentes com a capacitação espermática, assim como não aumentou a porcentagem de espermatozoides hiperativados quando tais células foram submetidas à capacitação *in vitro*. Além disso, parâmetros de qualidade relacionados à motilidade e funcionalidade espermática não foram prejudicados pela prévia privação de contato entre espermatozoide e plasma seminal, podendo ainda ser observado uma maior resistência à lesão acrossomal quando tal fluido esteve ausente.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho contribui para o melhor entendimento de como fatores presentes no plasma seminal, neste caso particulares à fração rica do ejaculado suíno, podem atuar sobre espermatozoides durante seu armazenamento sob refrigeração, prática altamente incorporada na suinocultura comercial. Ao contrário do observado quando espermatozoides são expostos ao plasma seminal por curtos períodos (criopreservação), nossos resultados demonstram que quando o período de exposição ao plasma seminal supera aquele que seria considerado fisiológico, danos celulares irreversíveis podem ser agravados, como é o caso da lesão acrossomal. Considerando a prática de preparo de doses inseminantes na rotina da suinocultura, na qual todo o plasma seminal presente no ejaculado é mantido, consideramos precoce a recomendação de uma prévia centrifugação e retirada deste fluido antes do processo de refrigeração. Isto porque, os índices reprodutivos alcançados convencionalmente são mais do que satisfatórios, muito provavelmente em função da alta concentração espermática utilizada por dose inseminante, o que acaba por compensar possíveis perdas celulares. No entanto, cabe aqui espaço para estudos *in vivo* à fim de comprovar que a perda de espermatozoides com acrossoma lesado pode ser muito significativa quando trabalhamos com doses inseminantes de menor concentração espermática, podendo resultar em quedas no desempenho reprodutivo e consequentes prejuízos na produção de suínos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AITKEN, R. J.; JONES, K. T.; ROBERTSON, S. A. Reactive oxygen species and sperm function--in sickness and in health. **Journal of Andrology**, v. 33, p. 1096–1106, 2012.
- ALKMIN, D. V.; PEREZ-PATÍÑO, C.; BARRANCO, I.; PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J. M.; MARTÍNEZ, E. A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; ROCA, J. Boar sperm cryosurvival is better after exposure to seminal plasma from selected fractions than to those from entire ejaculate. **Cryobiology**, v. 69, p. 203–210, 2014.
- AMARAL, A.; LOURENÇO, B.; MARQUES, M.; RAMALHO-SANTOS, J. Mitochondria functionality and sperm quality. **Reproduction**, v. 146, p. R163–R174, 2013.
- AUSTIN, C. R. The capacitation of the mammalian sperm. **Nature**, v. 170, p. 326, 1952.
- BAJPAI, M.; DONCEL, G. F. Involvement of tyrosine kinase and cAMP-dependent kinase cross-talk in the regulation of human sperm motility. **Reproduction**, v. 126, p. 183–195, 2003.
- BARRANCO, I.; TVARIJONAVICIUTE, A.; PEREZ-PATÍÑO, C.; PARRILLA, I.; CERON, J. J.; MARTINEZ, E. A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; ROCA, J. High total antioxidant capacity of the porcine seminal plasma (SP-TAC) relates to sperm survival and fertility. **Scientific Reports**, p. 1–9, 2015.
- BARRIOS, B., FERNÁNDEZ-JUAN, M., MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. **Journal of Andrology**, v. 26, p. 539–549, 2005.
- 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. 235–243, 1983.
- BEDFORD, J. M. Mammalian fertilization misread? **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1275–1287, 1998.
- 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.
- BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I. Incremento da eficiência reprodutiva em programa de inseminação artificial (IA) no suíno. **Anais do 11º Congresso Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA)**, Belo Horizonte, p. 131–141, 1995.
- BORTOLOZZO, F.B.; MENEGAT, M.B.; MELLAGI, A.P.G.; BERNARDI, M.L.; WENTZ, I. New artificial insemination technologies for swine. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 80–84, 2015.

BORYSHPOLETS, S.; KOWALSKI, R. K.; DIETRICH, G. J.; DZYUBA, B.; CIERESZKO, A. Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters. **Theriogenology**, v. 80, p. 758–765, 2013.

BROMFIELD, J. J. Seminal fluid and reproduction: much more than previously thought. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 31, p. 627–636, 2014.

BROUWERS, J. F.; SILVA, P. F.; 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.

CABALLERO, I.; VAZQUEZ, J. M.; GARCÍA, E. M.; PARRILLA, I.; ROCA, J.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; MARTÍNEZ, E. A. Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa. **Theriogenology**, v. 70, p. 1352–1355, 2008.

CELEGHINI, E. C. C.; DE ARRUDA, R. P.; DE 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.

CENTURION, F.; VAZQUEZ, J. M.; CALVETE, J. J.; ROCA, J.; SANZ, L.; PARRILLA, I.; GARCIA, E. M.; MARTÍNEZ, E. A. Influence of porcine spermadhesins on the susceptibility of boar spermatozoa to high dilution. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 640–646, 2003.

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.

CHANG, M. C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. **Nature**, v. 168, p. 697–698, 1951.

CHANG, H.; SUAREZ, S. S. Rethinking the relationship between hyperactivation and chemotaxis in mammalian sperm. **Biology of Reproduction**, v. 83, p. 507–513, 2010.

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.

COLÁS, C.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Caffeine induces ram sperm hyperactivation independent of cAMP-dependent protein kinase. **International Journal of Andrology**, v. 33, p. e187–e197, 2010.

DASKALOVA, D.; KUKOV, A.; KIRILOVA, I.; IVANOVA-KICHEVA, M. Protein analysis of boar seminal plasma proteins with protective effect during low-temperature storage of spermatozoa. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 28, 716–720, 2014.

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 LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 48–54, 1997.

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

DOSTÁLOVA, Z.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; TOPFER-PETERSEN, E. Quantitation of boar spermadhesins in accessory sex gland fluids and on the surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1200, p. 48–54, 1994.

DZIEKOŃSKA, A.; ŚWIADER, K.; KOZIOROWSKA-GILUN, M.; MIETELSKA, K.; ZASIADCZYK, L.; KORDAN, W. Effect of boar ejaculate fraction, extender type and time of storage on quality of spermatozoa. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 20, p. 77–84, 2017.

FERNÁNDEZ-GAGO, R.; DOMÍNGUEZ, J. C.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: a flow cytometry study. **Theriogenology**, v. 80, p. 400–410, 2013.

FERRAMOSCA, A.; ZARA, V. Bioenergetics of Mammalian Sperm Capacitation. **BioMed Research International**, p. 1–8, 2014.

FLESCH, F. M.; COLENBRANDER, B.; 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.

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

GADELLA, B. M.; BOERKE, A. An update on post-ejaculatory remodeling of the sperm surface before mammalian fertilization. **Theriogenology**, v. 85, p. 113–124, 2016.

GADELLA, B. M.; TSAI P.; BOERKE, A.; BREWIS, I. A. Sperm head membrane reorganization during capacitation. **International Journal of Developmental Biology**, v. 52, p. 473–480, 2008.

GALLON, F.; MARCHETTI, C.; JOUY, N.; MARCHETTI, P. The functionality of mitochondria differentiates human spermatozoa with high and low fertilizing capability. **Fertility Sterility**, v. 86, p. 1526–1530, 2006.

GARCIA, E. M.; VAZQUEZ, J. M.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; CABALLERO, I.; PARRILLA, I.; GIL, M. A.; ROCA, J.; MARTÍNEZ, E. A. Dissecting the protective effect of the seminal plasma spermadhesin PSP-I/PSP-II on boar sperm functionality. **Journal of Andrology**, v. 27, p. 434–443, 2006.

GARCÍA, J.C.; DOMÍNGUEZ, J.C.; PEÑA, F.J.; ALEGRE, B.; GONZALEZ, R.; CASTRO, M.J.; HABING, G.G.; KIRKWOOD, R.N. Thawing boar semen in the presence of seminal plasma: Effects on sperm quality and fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 119, p. 160–165, 2010.

GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J.; GÓMEZ-IZQUIERDO, E.; TOMÁS, C.; GONZÁLEZ-BULNES, A.; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, R.; DE MERCADO, E. Inclusion of seminal plasma in sperm cryopreservation of Iberian pig. **Animal Reproduction Science**, v. 130, p. 82–90, 2012.

GONZÁLEZ-CADAVID, V.; MARTINS, J. A. M.; MORENO, F. B.; ANDRADE, T. S.; SANTOS, A. C. L.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; MOREIRA, R. A.; MOURA, A.A. Seminal plasma proteins of adult boars and correlations with sperm parameters. **Theriogenology**, v. 82, p. 697–707, 2014.

GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Effects of reactive oxygen species on sperm function. **Theriogenology**, v. 78, p. 1700–1708, 2012.

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.

HENNING, H.; PETRUNKINA, A. M.; HARRISON, R. A. P.; WABERSKI, D. Bivalent response to long-term storage in liquid-preserved boar semen: a flow cytometric analysis. **Cytometry Part A**, v. 81A, p. 576–587, 2012.

HO, H.; SUAREZ, S. S. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. **Reproduction**, v. 122, p. 519–526, 2001.

HOSSAIN, S.; JOHANNISSON, A.; SIQUEIRA, A. P.; WALLGEN, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Spermatozoa in the sperm-peak-fraction of the boar ejaculate show a lower flow of Ca²⁺ under capacitation conditions post-thaw which might account for their higher membrane stability after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 128, p. 37–44, 2011.

HU, Y. A.; LU, J. C.; SHAO, Y.; HUANG, Y. F.; LU, N. Q. Comparison of the semen analysis results obtained from two branded computer-aided sperm analysis systems. **Andrologia**, v. 45, p. 315–318, 2013.

- IDZIOREK, T.; ESTAQUIER, J.; DE BELS, F.; AMEISEN, J. C. YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. **Journal of Immunological Methods**, v. 185, p. 249–258, 1995.
- JOHNSON, L. A.; WEITZE, K. F.; FISER, P.; MAXWELL, W. M. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 143–172, 2000.
- JUYENA, N. S.; STELLETTA, C. Seminal plasma: An essential attribute to spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 33, p. 536–551, 2012.
- KACZMAREK, M. M.; KRAWCZYNSKI, K.; FILANT, J. Seminal plasma affects prostaglandin synthesis and angiogenesis in the porcine uterus. **Biology of Reproduction**, v. 88, p. 1–11, 2013.
- KNOX, R. V. Artificial insemination in pigs today. **Theriogenology**, v. 85, p. 83–93, 2016.
- KNOX, R. V. The fertility of frozen boar sperm when used for artificial insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 90–97, 2015.
- KOZIOROWSKA-GILUN, M.; KOZIOROWSKI, M.; STRZEŻEK, J.; FRASER, L. Seasonal changes in antioxidant defense systems in seminal plasma and fluids of the boar reproductive tract. **Reproductive Biology**, v. 11, p. 37–47, 2011.
- KUMARESAN, A.; KADIRVEL, G.; BUJARBARUAH, K. M.; BARDOLOI, R.K.; DAS, A.; KUMAR, S.; NASKAR, S. Preservation of boar semen at 18 °C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 110, p. 162–171, 2009.
- LEAL, D.F.; TORRES, M.A.; RAVAGNANI, G.M.; MARTINS, S.M.M.K.; MEIRELLES, F.V.; DE ANDRADE, A.F.C. Absence of seminal plasma from sperm-rich fraction decreases boar sperm quality characteristics during the course of liquid storage. **Animal Reproduction Science**, 2018. No prelo.
- LÓPEZ-ÚBEDA, R; MATÁS, C. An approach to the factors related to sperm capacitation process. **Andrology**, v. 4, p. 7–9, 2015.
- LUNA, C.; YESTE, M.; ALAMO, M. M. R.; DOMINGO, J.; CASAO, A.; RODRIGUEZ-GIL, J. E.; PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Effect of seminal plasma proteins on the motile sperm subpopulations in ram ejaculates. **Reproduction, Fertility and Development**, A-L, 2015.
- MAREE, L.; VAN DER HORST, G. Quantification and identification of sperm subpopulations using computer-aided sperm analysis and species-specific cut-off values for swimming speed. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 88, p. 181–193, 2013.
- MARQUEZ, B.; SUAREZ, S. S. Different signaling pathways in bovine spermatozoa regulate capacitation and hyperactivation. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 1626–1633, 2004.

MC PARTLIN, L. A.; SUAREZ, S. S.; CZAYA, C. A.; HINRICHS, K.; BEDFORD-GUAUS, S. J. Hyperactivation of stallion spermatozoa is required for successful in vitro fertilization of equine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 81, p. 199–206, 2009.

MEDRANO, A.; WATSON, P. F.; HOLT, W. V. Investigation of pig sperm plasma membrane reorganization using progesterone-albumin-fluorescein probes. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 1, p. 27–33, 2012.

MOORE AI, SQUIRES EL, GRAHAM JK. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 63, p. 2372–2381, 2005.

NEILD, D. M.; BROUWERS, J. F.; COLENBRANDER, B.; AGÜERO, A.; GADELLA, B. M. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 72, p. 230–238, 2005.

OKAZAKI, T.; ABE, S.; YOSHIDA, S.; SHIMADA, M. Seminal plasma damages sperm during cryopreservation, but its presence during thawing improves semen quality and conception rates in boars with poor post-thaw semen quality. **Theriogenology**, v. 71, p. 491–498, 2009.

OKAZAKI, T.; SHIMADA, M. New strategies of boar sperm cryopreservation: development of novel freezing and thawing methods with a focus on the roles of seminal plasma. **Animal Science Journal**, v. 83, p. 623–629, 2012.

O'LEARY, S.; JASPER, M. J.; WARNES, G.M.; ARMSTRONG, D. T.; ROBERTSON, A. S. Seminal plasma regulates endometrial cytokine expression, leukocyte recruitment and embryo development in the pig. **Reproduction**, v. 128, p. 237–247, 2004.

OLSON, S. D.; FAUCI, L. J.; SUAREZ, S. S. Mathematical modeling of calcium signaling during sperm hyperactivation. **Molecular Human Reproduction**, v.17, p. 500–510, 2011.

PAOLI, D.; GALLO, M.; RIZZO, F.; BALDI, E.; FRANCAVILLA, S.; LENZI, A.; LOMBARDO, F.; GANDINI, L. Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility. **Fertility Sterility**, v. 95, p. 2315–2319, 2011.

PAVANELI, A.P.P.; TORRES, M.A.; RAVAGNANI G.M.; PASSARELLI, M.S.; MARTINS, S.M.M.K.; ANDRADE, A.F.C. Caracterização do espermatozoide suíno hiperativado através do sistema computadorizado de análise de sêmen. **Anais do XVIII Congresso da Abraves**, Goiânia, p. 235–236, 2017.

PEÑA, F. J.; SARAVIA, F.; GARCÍA-HERREROS, M.; NÚÑEZ-MARTÍNEZ, I.; TAPIA, J. Á.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to post thaw quality. **Journal of Andrology**, v. 26, p. 716–723, 2005.

PEÑA, F. J.; SARAVIA, F.; NÚÑEZ-MARTÍNEZ, 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.

PEREZ-PATÍÑO, C.; BARRANCO, I.; PARRILLA, I.; VALERO, M. L.; MARTÍNEZ, E. A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; ROCA, J. Characterization of the porcine seminal plasma proteome comparing ejaculate portions. **Journal of Proteomics**, v. 142, p. 15–23, 2016.

PETRUNKINA, A. M.; WABERSKI, D.; BOLLWEIN, H.; SIEME, H. Identifying non-sperm particles during flow cytometric physiological assessment: a simple approach. **Theriogenology**, v. 73, p. 995–1000, 2010.

PINART, E.; YESTE, M.; PRIETO-MARTÍNEZ, N.; REIXACH, J.; BONET, S. Sperm quality and fertility of boar seminal doses after 2 days of storage: Does the type of extender really matter? **Theriogenology**, v.83, p. 1428–1437, 2015.

QUILL, T. A.; SUGDEN, S. A.; ROSSI, K. L.; DOOLITTLE, L. K.; HAMMER, R. E.; GARBERS, D. L. Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 14869–14874, 2003.

RAMIÓ-LLUCH, L.; FERNÁNDEZ-NOVEL, J. M.; PEÑA, A.; COLÁS, C.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T.; RAMÍREZ, A.; CONCHA, I. I.; RIGAU, T.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. ‘*In Vitro*’ Capacitation and Acrosome Reaction are Concomitant with Specific Changes in Mitochondrial Activity in Boar Sperm: Evidence for a Nucleated Mitochondrial Activation and for the Existence of a Capacitation-Sensitive Subpopulational Structure. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 664–673, 2011.

RATHI, R.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M.; GADELLA, B. M. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 65(2), p. 462–470, 2001.

RICE, J. B.; STOLL, L. L.; LI, W. G.; DENNING, G. M.; WEYDERT, J.; CHARIPARE, E.; RICHENBACHER, W. E.; MILLER, F. J. JR.; WEINTRAUB, N. L. Low-level endotoxin induces potent inflammatory activation of human blood vessels: inhibition by statins. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 23, p. 1576–1582, 2003.

RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; ESTRADA, E. Artificial insemination in boar reproduction. In: Bonet, S.; Casas, I.; Holt, W. V.; Yeste, M. **Boar reproduction**. Springer, 2013. Berlin, p. 589–608.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 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.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; KVIST, U.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; JOHANNISSON, A.; SANZ, L.; PEÑA, F. J.; MARTÍNEZ, E. A.; ROCA, J.; VÁZQUEZ, J. M.; CALVETE, J. J. The physiological roles of the boar ejaculate. **Society of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 6, p. 1–21, 2009.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; TIENTHAL, P.; JOHANNISSON, A.; VÁZQUEZ, J. M.; MARTÍNEZ, E.; ROCA, J.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. Boar spermatozoa in the oviduct. **Theriogenology**, v. 63, p. 514–535, 2005.

ROZEBOOM, K. J.; TROEDSSON, M. H.; HODSON, H. H.; SHURSON, G. C.; CRABO, B. G. The importance of seminal plasma on the fertility of subsequent artificial inseminations in swine. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 443–448, 2000.

SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; JOHANNISSON, A.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; PEÑA, F. J.; ROCA, J.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Exposure to the seminal plasma of different portions of the boar ejaculate modulates the survival of spermatozoa cryopreserved in Mini FlatPacks. **Theriogenology**, v. 71, p. 662–675, 2009.

SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; JOHANNISSON, A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Controlled cooling during semen cryopreservation does not induce capacitation of spermatozoa from two portions of the boar ejaculate. **International Journal of Andrology**, v. 30, p. 485–499, 2007.

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

SHADAN, S.; JAMES, P. S.; HOWES, E. A.; JONES, R. Cholesterol efflux alters lipid raft stability and distribution during capacitation of boar spermatozoa. **Biology Reproduction**, v. 71, p. 253–265, 2004.

SILVEIRA, P. R. S.; SCHEID, I. A inseminação artificial na suinocultura. **Suinocultura Industrial**, Anuário da Suinocultura Industrial, p. 22–26, 2002.

SOUSA, A. P.; AMARAL, A.; BAPTISTA, M.; TAVARES, R.; CABALLERO CAMPO, P.; CABALLERO PEREGRÍN, P.; FREITAS, A.; PAIVA, A.; ALMEIDA-SANTOS, T.; RAMALHO-SANTOS, J. Not all sperm are equal: functional mitochondria characterize a subpopulation of human sperm with better fertilization potential. **PLoS One**, v. 3, 6:e18112, 2011.

STAUSS, C. R.; VOTTA, T. J.; SUAREZ, S. S. Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 1280–1285, 1995.

SUAREZ, S.; REDFERN, K.; RAYNOR, P.; MARTIN, F.; PHILLIPS, D. M. Attachment of boar sperm to mucosal explants of oviduct in vitro: possible role in formation of a sperm reservoir. **Biology of Reproduction**, v. 44, p. 998–1004, 1991.

SUAREZ, S. S.; HO, H. C. Hyperactivated motility in sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, p. 119–124, 2003.

TARDIF, S.; DUBE, C.; CHEVALIER, S.; BAILEY, J. L. Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 784–792, 2001.

THÉRIEN, I.; BOUSQUET, D.; MANJUNATH, P. Effect of seminal phospholipid-binding proteins and follicular fluid on bovine sperm capacitation. **Biology Reproduction**, v. 65, p. 41–51, 2001.

TORRES, M. A.; RAVAGNANI, G. M.; LEAL, D. F.; MARTINS, S. M. M. K.; MURO, B. B. D.; MEIRELLES, F. V.; PAPA, F. O.; DELL'AQUA JUNIOR, J. A.; ALVARENGA, M. A.; MORETTI, A. S.; DE ANDRADE, A. F. C. Seminal plasma arising from the whole boar sperm-rich fraction increases the stability of sperm membrane after thawing. **Journal of Animal Science**, v. 94, p. 1906–1912, 2016.

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.; ROBERTS, K. P. Seminal plasma proteins inhibit in vitro- and cooling induced capacitation in boar spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, p. 893–900, 2010.

VISCONTI, P. E.; KRAPF, D.; VEGA-BELTRÁN, J. L.; ACEVEDO, J. J.; DARSZON, A. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, p. 395–405, 2011.

VISCONTI, P. E. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. **PNAS**, v. 106, p. 667–668, 2009.

WABERSKI, D.; HENNING, H.; PETRUNKINA, A. M. Assessment of storage effects in liquid preserved boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 45–48, 2011.

WANG, M. J.; OU, J. X.; CHEN, G. W.; WU, J. P.; SHI, H. J.; O, W. S.; MARTIN-DELEON, P. A.; CHEN, H. Does prohibitin expression regulate sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and male fertility? **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 17, p. 513–519, 2012.

YANAGIMACHI, R. In vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 18, p. 275–286, 1969.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: Knobil, E.; Neill, J. D. **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, p. 189–317, 1994.

YESTE, M. State-of-the-art of boar sperm preservation in liquid and frozen state. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 1, p. 69–81, 2017.

YESTE, M.; FERNÁNDEZ-NOVEL, J. M.; RAMÍO-LLUCH, L.; ESTRADA, E.; ROCHA, L. G.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T.; CONCHA, I. I.; RAMÍREZ, A.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. Intracellular calcium movements of boar spermatozoa during 'in vitro' capacitation and subsequent acrosome exocytosis follow a multiple-storage place, extracellular calcium-dependent model. **Andrology**, v. 3, p. 729–747, 2015.

APÊNDICE A

EXPERIMENTO PRÉVIO: Caracterização do padrão cinético apresentado pelo espermatozoide suíno hiperativado sob análise computadorizada do sêmen (CASA) utilizando o software *Sperm Class Analyzer (SCA®)*

Figura 12 – Esquema representativo do prévio experimento realizado para a caracterização do padrão de motilidade apresentado pelo espermatozoide suíno hiperativado

Fonte: (PAVANELI, A.P.P., 2018).

1) Coleta da fração rica do ejaculado, n=9. 2) Diluição da fração rica em meio TALP *sperm* (concentração de cálcio ajustada). 3) Preparo do tratamento HIPER (indução da hiperativação espermática) após adição de ICa^{2+} ; 4) Tratamento controle (CON), representado apenas pela diluição previamente realizada. 5) Incubação à 38,5 °C e 5% CO_2 por 30 min. 6) Análise CASA.

1) Características de motilidade avaliadas pelo CASA

As características avaliadas neste estudo foram as seguintes: Velocidade média de percurso (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade em linha reta (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide (ALH, μm),

frequência do batimento flagelar cruzado (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade (LIN, %) e índice de oscilação (WOB, %).

2) Escolha de características de motilidade com menor coeficiente de variação

Tabela 8 – Efeito de tratamento (P), valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação obtidos para cada uma das características a partir da diferença entre valores de amostras induzidas e não induzidas à hiperativação espermática

Característica de motilidade	P	Média	DP	CV
VCL	0,0009	19,61778	11,54335	58,84
VSL	<.0001	-30,0056	8,80709	-29,35
VAP	0,0004	-23,0267	12,03867	-52,28
STR	<.0001	-30,3444	5,195	-17,12*
LIN	<.0001	-49,5033	6,2571	-12,64*
ALH	<.0001	2,543333	0,36521	14,36*
BCF	<.0001	-1,69	0,68491	-40,53
WOB	<.0001	-43,6833	4,52181	-10,35*

Fonte: (PAVANELI, A.P.P., 2018).

DP, desvio padrão; CV, coeficiente de variação; VCL, velocidade curvilínea; VSL, velocidade em linha reta; VAP, velocidade média de percurso; STR, retilinearidade; LIN, linearidade; ALH, amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide; BCF, frequência do batimento flagelar cruzado; WOB, índice de oscilação.

3) Definição de valores para caracterização do espermatozoide suíno à partir de características previamente selecionadas

Tabela 9 – Médias de ambos os tratamentos corrigidas pelo acréscimo ou subtração de três desvios padrões

CON				HIPER			
LIN	STR	ALH	WOB	LIN	STR	ALH	WOB
45,76	58,15	2,97	73,88	41,45	79,57	3,16	53,89

Fonte: (PAVANELI, A.P.P., 2018).

CON, espermatozoides não hiperativados; HIPER, espermatozoides hiperativados; LIN, linearidade; STR, retilinearidade; ALH, amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide; WOB, índice de oscilação.

Figura 13 – Padrão cinético de espermatozoide suíno não hiperativado

Fonte: (PAVANELI, A.P.P., 2018).

A) Demonstração por trajeto gráfico. B) Imagem obtida no momento da análise. Ambos obtidos através do software *Sperm Class Analyzer* (SCA®).

Figura 14 – Padrão cinético de espermatozoide suíno hiperativado

Fonte: (PAVANELI, A.P.P., 2018).

A) Demonstração por trajeto gráfico. B) Imagem obtida no momento da análise. Ambos obtidos através do software *Sperm Class Analyzer* (SCA®).

APÊNDICE B

Tabela 10 – Características de motilidade apresentadas por espermatozoides suínos submetidos à capacitação in vitro, após terem sido refrigerados na presença (MPS) ou não do plasma seminal (RPS)

RAP (%)	0	52,60 ± 2,51	49,52 ± 2,37	51,06 ± 1,72 ^A
	2	24,92 ± 2,84	25,09 ± 2,52	25,00 ± 1,89 ^B
	4	21,74 ± 2,94	19,92 ± 2,46	20,83 ± 1,91 ^B
	Média ²	33,21 ± 2,00 ^a	31,56 ± 1,80 ^a	
VAP (µm/s)	0	59,95 ± 1,78	59,20 ± 1,83	59,57 ± 1,27 ^A
	2	47,40 ± 2,09	46,01 ± 2,00	46,70 ± 1,44 ^B
	4	39,42 ± 2,21	40,10 ± 1,96	39,76 ± 1,47 ^C
	Média ²	48,94 ± 1,38 ^a	48,44 ± 1,30 ^a	
VSL (µm/s)	0	50,23 ± 1,47	48,63 ± 1,36	49,43 ± 1,00 ^A
	2	43,30 ± 2,07	42,21 ± 1,99	42,75 ± 1,43 ^B
	4	35,94 ± 2,20	36,89 ± 1,96	36,42 ± 1,46 ^C
	Média ²	43,16 ± 1,22 ^a	42,58 ± 1,11 ^a	
VCL (µm/s)	0	71,36 ± 1,96	71,02 ± 2,04	71,19 ± 1,41 ^A
	2	54,44 ± 2,07	52,94 ± 2,00	53,68 ± 1,43 ^B
	4	46,88 ± 2,12	46,72 ± 1,90	46,80 ± 1,42 ^C
	Média ²	57,58 ± 1,47 ^a	56,89 ± 1,44 ^a	
LIN (%)	0	70,72 ± 1,24	68,96 ± 1,17	69,84 ± 0,85 ^C
	2	79,80 ± 1,18	80,37 ± 1,05	80,08 ± 0,79 ^A
	4	75,03 ± 1,47	77,34 ± 1,43	76,20 ± 1,03 ^B
	Média ²	75,04 ± 0,82 ^a	75,37 ± 0,83 ^a	
BCF (%)	0	5,56 ± 0,07 ^a	5,46 ± 0,07 ^a	5,51 ± 0,05
	2	5,81 ± 0,07 ^a	5,88 ± 0,07 ^a	5,85 ± 0,05
	4	5,98 ± 0,08 ^a	5,71 ± 0,09 ^b	5,85 ± 0,06
	Média ²	5,78 ± 0,05	5,68 ± 0,05	
WOB (%)	0	84,32 ± 0,61	83,59 ± 0,61	83,96 ± 0,43 ^B
	2	86,96 ± 0,85	86,69 ± 0,82	86,83 ± 0,59 ^A
	4	82,42 ± 1,19	84,65 ± 1,09	83,53 ± 0,81 ^B
	Média ²	84,52 ± 0,55 ^a	84,98 ± 0,51 ^a	
ALH (µm/s)	0	2,19 ± 0,06	2,19 ± 0,06	2,19 ± 0,04 ^A
	2	1,52 ± 0,04	1,52 ± 0,04	1,52 ± 0,03 ^B
	4	1,48 ± 0,03	1,43 ± 0,04	1,46 ± 0,03 ^B
	Média ²	1,73 ± 0,04 ^a	1,72 ± 0,04 ^a	
STR (%)	0	84,08 ± 0,92	83,19 ± 0,82	83,64 ± 0,62 ^B
	2	91,24 ± 0,56	91,72 ± 0,48	91,48 ± 0,37 ^A
	4	89,98 ± 0,61	91,06 ± 0,59	90,52 ± 0,43 ^A
	Média ²	88,37 ± 0,50 ^a	88,65 ± 0,50 ^a	

Fonte: (PAVANELI, A.P.P., 2018).

ALH, amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide; BCF, frequência do batimento flagelar cruzado; LIN, linearidade; Média¹, médias de tempo; Média², médias de tratamento; MPS, manutenção do plasma seminal; RAP, espermatozoides rápidos; RPS, remoção do plasma seminal; STR, retilinearidade; VAP, velocidade média de percurso; VCL, velocidade curvilínea; VSL, velocidade em linha reta; WOB, índice de oscilação; Diferentes letras minúsculas sobrescritas indicam diferenças significativas entre os tratamentos (P < 0,05). Diferentes letras maiúsculas sobrescritas indicam diferenças significativas entre os tempos (P < 0,05).