GABRIELA BERTAIOLLI ZOCA

**Efeitos da presença do plasma seminal sobre a integridade de membranas,
cromatina e citoesqueleto de espermatozoides de touros.**

Pirassununga

2019

GABRIELA BERTAIOLLI ZOCA

**Efeitos da presença do plasma seminal sobre a integridade de membranas,
cromatina e citoesqueleto de espermatozoides de touros.**

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

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda

Pirassununga
2019

RESUMO

ZOCA, G. B. **Efeitos da presença do plasma seminal sobre a integridade de membranas, cromatina e citoesqueleto de espermatozoides de touros.** 2019. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Muitos dos protocolos de congelamento utilizados ainda hoje são empíricos com cerca de 40 a 50% de espermatozoides não sobreviventes ao processo e aqueles que sobrevivem são afetados estrutural ou funcionalmente após a descongelamento. Ademais, existem controversas quanto aos efeitos do plasma seminal no processo de congelamento, podendo ser benéficos quanto a capacitação ou deletérios quanto ao armazenamento e criopreservação espermática. Definir o efeito da retirada do plasma seminal em cada etapa do processo de congelamento, assim como o momento mais crítico e prejudicial aos espermatozoides seria importante para o avanço da criopreservação do sêmen bovino. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da remoção do plasma seminal e do processo de congelamento sobre a integridade de membranas plasmática e acrossomal, potencial mitocondrial, remodelamento dos filamentos de actina do citoesqueleto e fragmentação de cromatina espermática durante a refrigeração, período de equilíbrio e congelamento/descongelamento. Para isso, cada ejaculado foi dividido em duas alíquotas (com plasma seminal= PS e sem plasma seminal= SPS) com concentração final de 50×10^6 esptz/palheta, envasadas em palhetas de 0.5mL e acondicionadas em uma máquina de congelamento automática com porta-palhetas vertical. Foram realizadas 41 colheitas de 7 touros da raça Nelore. Os dados obtidos dos procedimentos experimentais foram analisados com auxílio do software *Statistical Analysis for Windows SAS®*, versão 9.3 (SAS 2005). Houve efeito das etapas do processo de congelamento para todas as características estudadas exceto fragmentação de cromatina. A presença ou ausência do plasma seminal não diferiu significativamente em nenhuma das características estudadas. A média total das etapas dos tratamentos SP foi superior estatisticamente que a média total do tratamento SPS para integridade acrossomal e remodelamento de F-actina. Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) de etapa ou tratamento para a fragmentação de cromatina. O período de equilíbrio diferiu significativamente da refrigeração para AI, APM e remodelamento de F-actina. A etapa de congelamento/descongelamento foi a etapa mais prejudicial para as membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial dos espermatozoides. No entanto, é na

refrigeração onde ocorre maior taxa de remodelamento dos filamentos de actina do citoesqueleto de espermatozoides bovinos.

Palavras-chave: Espermatozoide. Congelação. Refrigeração. Período de equilíbrio. Touros.

ABSTRACT

ZOCA, G. B. **Effects of the presence of seminal plasma on the integrity of membranes, chromatin and cytoskeleton of bull spermatozoa.** 2019. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019

Many of the freezing protocols used today are empirical with about 40 to 50% non-surviving spermatozoa and those that survive are structurally or functionally affected after thawing. Moreover, there are controversies regarding the effects of seminal plasma on the freezing process, which may be beneficial for capacitation or deleterious for sperm storage and cryopreservation. Defining the effect of seminal plasma withdrawal at each stage of the freezing process, as well as the most critical and damaging moment for spermatozoa would be important for the advancement of bovine semen cryopreservation. The aim of this study was to evaluate the effect of seminal plasma removal and freezing process on plasma and acrosomal membrane integrity, mitochondrial potential, remodeling of cytoskeleton actin filament and sperm chromatin fragmentation during cooling, equilibration period and freezing/thawing. For this, each ejaculate was divided into two aliquots (with seminal plasma = PS and without seminal plasma = SPS) with a final concentration of 50×10^6 spz/straw, packed in 0.5mL straws and put in an automatic freezer machine with vertical straw holder. Forty-one ejaculates were collected out from 7 Nelore bulls. Data obtained from the experimental procedures were analyzed with the aid of *Statistical Analysis for Windows SAS®* software, version 9.3 (SAS 2005). The presence or absence of seminal plasma did not differ significantly in any of the characteristics studied. The total mean of the stages of SP treatment was statistically higher than the total mean of the stages of SPS treatment for acrosomal integrity and F-actin remodeling. There was no statistical difference in the stages of freezing process or treatment (SP or SPS) for chromatin fragmentation. The equilibration period differed significantly from refrigeration for AI, APM and F-actin remodeling. The freeze/thaw stage was the most detrimental step for sperm plasma, acrosomal membranes and mitochondrial potential. However, it is in refrigeration where the highest rate of remodeling of bovine sperm cytoskeleton actin filaments occurs ($P > 0.05$).

Key-words: Spermatozoa. Freezing. Cooling. Equilibration period. Bulls.