

MARINA DA SILVA PASSARELLI

**Avaliação dos efeitos do tempo de equilíbrio nos protocolos de  
criopreservação do sêmen suíno: um estudo fisiológico e morfofuncional**

---

PIRASSUNUNGA

2019

MARINA DA SILVA PASSARELLI

**Avaliação dos efeitos dos tempos de equilíbrio nos protocolos de criopreservação do sêmen suíno: um estudo fisiológico e morfofuncional**

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:**

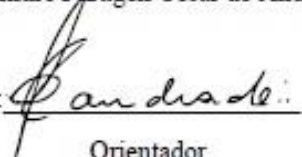
Reprodução Animal

**Área de concentração:**

Reprodução Animal

**Orientador:**

Prof. Dr. André Furugen Cesar de Andrade

De acordo: 

Orientador

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

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3844  
FMVZ

Passarelli, Marina da Silva

Avaliação dos efeitos do tempo de equilíbrio nos protocolos de criopreservação do sêmen suíno: um estudo fisiológico e morfofuncional / Marina da Silva Passarelli. – 2019.

89 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, Pirassununga, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

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

1. Criopreservação. 2. Tempo de equilíbrio. 3. Sêmen. 4. Viabilidade. 5. Suíno. I. Título.

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos efeitos do tempo de equilíbrio nos protocolos de criopreservação do sêmen suíno: um estudo fisiológico e morfofuncional", protocolada sob o CEUA nº 8215250417 (000000), sob a responsabilidade de **André Furugen César de Andrade** e equipe; Marina da Silva Passarelli - 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 **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 13/09/2017.

We certify that the proposal "Evaluation of equilibration time on boar semen cryopreservation protocols: a physiological and morphofunctional study", utilizing 6 Swines (6 males), protocol number CEUA 8215250417 (000000), under the responsibility of **André Furugen César de Andrade** and team; Marina da Silva Passarelli - 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 School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 09/13/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2017** a **09/2017**

Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Animais provenientes de outros projetos**

Espécie: **Suínos**

sexo: **Machos**

idade: **12 a 16 meses**

N: **6**

Linhagem: **DB Genética Suína- LI 7600®**

Peso: **200 a 300 kg**

Local do experimento: **Coleta de amostras seminais: Núcleo de Pesquisa em Suínos (NPS) Análises: Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos (LATES - FMVZ USP) e Laboratório de Morfofisiologia Molecular do Desenvolvimento (LMMD - FZEA USP)**

São Paulo, 06 de agosto de 2019

Profa. Dra. Annelise de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: PASSARELLI, Marina da Silva

Título: Avaliação dos efeitos dos tempos de equilíbrio nos protocolos de criopreservação do sêmen suíno: Um estudo fisiológico e morfofuncional

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: \_\_\_\_\_

*D*edico esta dissertação à minha amada família: papai (Antônio),  
mamãe (Regina) e Bruna.

*A aqueles que me escolheram ainda em outro plano  
como filha e irmã, responsabilizando-se de me amar, cuidar  
e me guiar em todos os momentos da minha vida. Garanto,  
com toda certeza, que exerceram e ainda exercem o papel que  
o Pai lhes atribuiu da forma mais perfeita.*

## *Agradecimentos*

À *Deus*, pela oportunidade da vida, mediante tantas bênçãos e graças. Obrigada, ela está sendo linda.

Aos meus pais, *Antônio* e *Regina*. Só vocês sabem o que esse mestrado significou na minha vida. *Saudade* seria a palavra que escolheria para essa fase quando penso em vocês. Saudade todos os dias. Saudade do cheiro de café todas as manhãs, do beijo de despedida antes de sair para trabalhar e das ligações no almoço para saber que horas chego em casa. Mas o que sinto mais saudade é de poder abraçar vocês quando tenho vontade, olhar nos olhos e dizer o quanto os amo e agradecer pela oportunidade de terem me escolhido como filha. Obrigada por me desejarem tanto e nunca desistirem de mim, mesmo quando eu já tinha desistido. Vocês são meus amores, meus amigos e meus irmãos. Vocês são minha força e minha dedicação. Tenho certeza que todos os obstáculos, todas as lágrimas, todas as decepções desta fase incrível que foi o meu mestrado, serviram como aprendizado, porque foi exatamente assim que vocês me criaram: olhar a tudo e a todos como materializações da nossa evolução. Obrigada por estarem ao meu lado em cada trato, em cada inseminação, em cada parto e análises laboratoriais. Sim, vocês estavam lá. Como vocês estão aqui agora. Vocês são parte de mim.

À minha amada irmã, *Bruna*. Você, que além de ser irmã, foi e ainda é minha mãe, amiga e confidente. Obrigada por me mostrar o mundo e por estender a mão em todos os momentos. Quantas histórias vivemos juntas, quantos segredos e confissões, quantas lágrimas e discussões. Mas que juntas só transbordamos amor e alegria. Obrigada por tudo. Eu te amo!

A minha afilhada e sobrinha, *Manuela (Manu)*. Obrigada por iluminar a minha vida com a sua pureza, encanto e alegria. Convivemos juntas por muitos meses na casa da vovó Regina e do vovô Passarelli, onde em cada intervalo dos meus estudos eu corria no quarto para te pegar no colo e ficar com você. Porém, o tempo me levou para um pouquinho longe e não estou podendo acompanhar seu crescimento e desenvolvimento, mas de uma coisa quero que saiba: eu estou com você e sempre estarei, seja pessoalmente, por chamadas de vídeo do WhatsApp ou pelos áudios gostosos no meio do dia. O meu coração está com você. Eu te amo muito e sempre estarei ao seu lado.

A *tia Rosa* por todas as preces dirigidas a mim durante toda a minha vida. Preces estas regadas de amor e carinho, sempre acreditando na minha capacidade e me dando forças para seguir com a minha jornada. Obrigada “Negrinha”, te amo demais!

Aos meus padrinhos, *Gilberto e Léia* por nunca medirem esforços para me ajudar. Sem dúvidas, meus pais escolheram as melhores pessoas para assumirem este papel. Essa jornada acadêmica jamais seria a mesma sem a participação de vocês. Com o coração cheio de amor, agradeço pela dedicação e apoio todos estes anos.

Aos amigos da minha amada São José do Rio Preto: *Marina (Mina), Frederico (Fred), André, Vitor (Viri), Danilo (Leta), Pedro (Pivi), João Victor (Bas), Antônio (Jr.), Flávia (Pagode), Leonardo (Léo)*, vocês são os irmãos de alma que Deus me permitiu chamar de amigos. Agradeço pela amizade de vocês todos os dias. Obrigada por estarem ao meu lado em tantos momentos especiais, e por fazerem parte desta fase que se finaliza. A distância e o tempo nunca foram um problema para nós, e que desta forma, possamos permanecer unidos sempre. À *Dandara (Dan), José Vitor (Kejo), Débora; Thaís (Thata), Mariana Gonçalves (Má) e Briele*, obrigada pelo amor, pela amizade, pelo zelo e preocupação sempre, amo vocês.

A minha querida “*Vize*” (*Larissa*) obrigada por nunca me abandonar e sempre cuidar de mim. Você é minha parte em Pirassununga. Minha companheira e amiga. Te agradeço do fundo do meu coração pelas conversas, desabafos, lágrimas, risadas, vinhos, festas, ressacas e confidências compartilhadas. Eu te amo muito e sempre estarei com você.

Aos professores, das diferentes instituições de ensino as quais tive a oportunidade de estudar, que fizeram e ainda fazem parte da minha vida: *tia Cláudia, tia Verinha, tias Martinha's, Ana Lúcia, Rita, Eduarda, Sibebe, Roberta, Daísa, José Carlos, Fernando (Careca), Alexandre (Garfield), Ricardo, David, Rodrigo (Gê), Edna, Élide, Nathália (Nathy), Candinha, Tatiana (Tati), Bruno (Brunão), Guilherme, Igor, Rodolfo, Roselene, Rosana, Fabiana; Karina, Carla, Giuliano, Talita, Cândice, João Morelli e Juliana*. Muito obrigada por me ensinarem a ler e a escrever, por me proporcionarem o conhecimento acadêmico e por contribuírem para o meu crescimento pessoal. Vocês, cada um da sua forma, fazem parte desta dissertação.

Ao *Prof. Dr. André (Simprão)*, pessoa a qual Deus colocou na minha trajetória, de uma forma tão particular, e com tive e ainda tenho, a oportunidade de conviver e chamar de



*orientador*. O senhor me auxiliou, me abriu portas e me fez evoluir não apenas dentro da academia, mas também na vida. A princípio, professor/orientador, hoje também um amigo e colega de profissão. Eu te agradeço em primeiro lugar pela confiança. Ela sempre esteve presente na nossa relação professor-aluna, e acho que isso sempre foi o que me deu forças para seguir trabalhando, mesmo diante das minhas inseguranças, que o senhor sabe, melhor do que ninguém o quanto ela pode me dominar. Esta confiança permitiu que o senhor me aceitasse em um primeiro momento, como sua aluna de iniciação científica, nos levando por um longo caminho de desafios, histórias e superações, e que nos permitiu estarmos aqui hoje. E aproveitando que falei sobre minhas inseguranças, te agradeço por sempre me dizer (do seu jeito peculiar) que sou capaz. Capaz de fazer o que eu sempre achei impossível. Quando olho para trás e vejo a Marina que entrou na sua sala em novembro de 2015, encontro uma completamente diferente hoje, que está aqui escrevendo esta dissertação, e isso, em maior parte, graças a você. Obrigada pelas péssimas piadas que só o senhor sabe fazer, mas que ainda assim, sempre conseguem me tirar um sorriso. Te agradeço também pelas lágrimas, felizes e tristes. Pelas palavras amigas e pelas broncas. Pelas infindáveis oportunidades a cada dia. Obrigada pelas reflexões filosóficas e profundas, que me permitiram enxergar a vida como ela realmente é, mas também de não deixar de acreditar nos meus princípios morais e éticos, na pessoa e profissional que sou e que quero ser. O senhor não imagina o carinho e respeito que tenho. Sentimentos estes que fazem as lágrimas virem aos olhos e me sentir tranquila mediante tudo o que vivemos nestes anos. Obrigada por absolutamente tudo, e principalmente, por me permitir fazer parte do Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos.

A *Dra. Simone*, a qual eu poderia chamar de várias formas: professora, amiga, conselheira, um exemplo de mulher e profissional que eu sei que jamais conseguirei ser, mas que sempre vou me lembrar e me inspirar. Poder trabalhar com você foi uma das maiores oportunidades que tive nesse período e agradeço à Deus por ter te colocado no meu caminho. Obrigada por absolutamente tudo.

Ao *Prof. Dr. Aníbal Sant'Anna Moretti* pelas palavras, ensinamentos, sorrisos e carinho sempre presente. Poder conviver com o senhor, mesmo que por pouco tempo, foi um imenso prazer. Obrigada por tudo que fez pela suinocultura, e principalmente, pelo nosso grupo.

À equipe de pós-graduandos do *Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos* (LATES - FMVZ/USP), tal como aos antigos integrantes, que de diferentes formas, contribuíram para o meu aprendizado e crescimento dentro do grupo. Aos que permaneceram

na minha trajetória eu agradeço. *Gisele (Gi)*, obrigada por ser a minha “irmã mais velha”, pelo cuidado e atenção desde o meu primeiro dia junto ao grupo. Sinto sua falta todos os dias. À *Mariana*, agradeço por todo conhecimento compartilhado. À *Ana Paula (Ana)*: acredito que você foi uma das pessoas que mais me fez crescer nesse núcleo. Com tantas diferenças fomos capazes de nos conhecer e reconhecer estas diferenças e ainda assim trabalharmos juntas. Você foi de suma importância neste período e te agradeço, mais uma vez, por toda ajuda. Você esteve comigo desde o princípio deste experimento. Muito obrigada! *Maitê* e *Denis*, formamos o nosso “*Trio Ternura*” e agradeço a vocês meus amigos e companheiros leais, por nunca me deixarem desistir e por me aceitarem da forma que sou, mediante tantos defeitos e falhas. Vocês foram minha base nesse laboratório e agradeço imensamente por isso, amo vocês! Ao *Cristian* agradeço pela amizade, companheirismo, confiança e palavras de apoio tantas e tantas vezes. Pode sempre contar comigo para tudo meu amigo. E à *Ana Carolina (Carol)*, que passou brevemente pela minha vida na graduação e tivemos a oportunidade de trabalharmos juntas nesse período da pós. Você sabe o quanto te admiro pela sua força e perseverança, e te desejo muita luz e sucesso.

Ao aluno de iniciação científica *Matheus Pasini (Monicão)*, obrigada pela ajuda desde o início deste projeto e pela confiança, por me permitir te “co-orientar”. Que você continue sendo este aluno e garoto tão especial, de coração puro e sempre disposto a ajudar. Pode contar comigo sempre, sendo como colegas de profissão ou como amigos que nos tornamos. Boa sorte na sua trajetória.

À *Flávia Freitas*, por ser essa amiga incondicional todos os momentos. Perto ou longe, nossa amizade se mantém viva, e como sempre, com esse “mineirês” maravilhoso, consegue me acalmar e me ajudando em todas as situações. Obrigada por acreditar em mim, e por ser um exemplo de mulher e profissional. Você não imagina o quanto te admiro.

As minhas amigas “Pietretes”: *Flávia*, *Mariana (Pallú)* e *Lais*, obrigada por serem exatamente como são e por terem estado tantas vezes ao meu lado, mesmo com a distância, com palavras, mensagens, momentos de silêncio e de lágrimas. Vocês foram e sempre serão um grande presente desta vida.

Ao *Guilherme Zanata (Gaúcho)*, agradeço pela amizade e companheirismo construídos. Por me aceitar na sua vida. Por ser um exemplo de profissional e ser humano. Por me mostrar

o carinho e o amor, e principalmente, como podemos ser mais felizes com as pessoas que amamos ao nosso lado.

Aos amigos que a pós-graduação me proporcionou: *Gabriela Dalmaso (Gabi)*, *Cecília, Igor, Gilmar, Gabriela Zoca (Gabi Zoca)*, *Mariana Ortolan, Laísa, Nathaly (Natyka)* e *Leonardo (Bati)*. Agradeço pela amizade, companhia, cumplicidade, sorrisos, bares, festas, disciplinas e experimentos. Esta fase da minha vida em Pirassununga/São Paulo ficará para sempre no meu coração graças a vocês, que fizeram cada momento valer a pena.

Aos secretários do departamento *Harumi* (São Paulo) e *Clayton* (Pirassununga). Obrigada pela atenção, ajuda e paciência ao longo destes meus quatro anos junto a Universidade de São Paulo. Muito obrigada, de coração.

A todos os funcionários, professores e alunos do *Departamento de Reprodução Animal* (VRA - FMVZ/USP), tanto em São Paulo como em Pirassununga, pela agradável convivência sempre. Agradecimentos em especial ao *Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda*, profissional que admiro e querido conterrâneo da nossa São José do Rio Preto; *Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini* pelo olhar cuidadoso, palavras doces, e educação sempre presentes, uma mulher dentro da ciência que admiro e me inspiro; ao *Prof. Dr. Guilherme Pugliesi* por toda atenção, humildade e simpatia; e a *Maíra (Doci)*, pela disponibilidade sempre em explicar, ajudar e conversar com todos ao seu redor.

Aos animais/cachaços: *Betão, Willy, Donnie, Jhonny, Gilbert, Jack* e *Bacon*, doadores do material biológico (sêmen) utilizado para a execução deste e tantos outros experimentos, além de permitirem aprender tudo o que sei. Cuidar de vocês foi um dos maiores privilégios que tive nestes anos. Muito obrigada.

Aos funcionários da suinocultura experimental: *Anderson, sr. Mária, Ademilson, Ademir* e *Agnaldo*, agradeço imensamente por toda ajuda, confiança e simpatia durante a execução deste experimento e por todos os cuidados com os animais.

A equipe de motoristas do nosso campus Fernando Costa, especialmente ao *Esteves* e *André*. Obrigada por toda atenção e carinho. Através de vocês, enxerguei como um simples “bom dia” ou “bom descanso” com sorriso no rosto, pode mudar o dia de uma pessoa.

À *dona Meire*, o meu muito obrigada por me olhar como filha. Sempre cuidando do nosso laboratório, da nossa granja, e também da minha casa, como se fosse sua. Obrigada pela preocupação, pelo olhar carinhoso e pelas palavras com amor. A senhora foi uma imagem de mãe que sempre tive em Pirassununga e te agradeço muito por cada sorriso retribuído e olhar sincero. Vou ter a senhora para sempre no meu coração.

Ao *Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira* (UNESP – Jaboticabal), agradeço por aceitar o meu convite no ano de 2014 para ministrar uma palestra na Semana Acadêmica da UNIRP no módulo de aves e suínos. Foi nesta palestra que me encontrei profissionalmente, que me inspirou a seguir o sonho que estou realizando: fazer um mestrado. Lhe agradeço por me aceitar como estagiária meses depois, período este curto, porém de grande aprendizado, no quesito pessoal especialmente. As suas palavras e orientações foram de suma importância naquela época e que as lembro com grande carinho até hoje. Obrigada por toda atenção sempre.

A *Profa. Dra. Leticia Zoccolaro Oliveira*, por ser esta mulher incrível. A senhora é o verdadeiro exemplo do quanto uma pessoa pode contribuir para o futuro de outra. Sei que o nosso encontro nessa vida teve um significado enorme. Se vivi tudo o que vivi junto ao Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos, foi graças a essa bela amizade que você e o professor André construíram há tantos anos. Mais uma vez (dentre tantas mil que já lhe agradei), muito obrigada. Obrigada por cada conselho amigo. A senhora é muito mais que uma antiga professora, é uma amiga, uma colega de profissão que tenho o prazer de ter na minha vida. Escrever esta dissertação mostra o quanto a sua participação foi e sempre será significativa para mim. Obrigada por tudo sempre!

Ao *Prof. Dr. George Shigueki Yasui* por abrir as portas do Laboratório de Biotecnologia de Peixes – CEPTA/ICMBio – Pirassununga, permitindo que eu realizasse as análises de citometria de fluxo, e a sua aluna *Nathália Alcântara*. Aos dois, agradeço imensamente pela educação, ajuda, carisma e humildade sempre.

Ao *Dr. Marc Yeste*. Te admirar como profissional, sempre foi algo claro, desde o primeiro dia em que nos conhecemos em 2016. Porém lhe conhecer como homem e ser humano, foi e sempre será uma das grandes honras dessa vida. Me permitiu encontrar o que sempre busquei nas pessoas: humildade, simplicidade, lealdade com os seus ideais, respeito, olhar sincero e atento, compaixão, carinho e amor. Amor pelo o que faz, amor pelo próximo, amor

pela vida. Obrigada por cada oportunidade. Obrigada por todos os ensinamentos. Gràcies per tot!

*Dra. Isabel Barranco*, por la amistad. Uno de mis mayores temores de hacer mi intercambio en España era el facto de estar sola. No tener a las personas que tanto amo a mi lado. No tener a nadie con quien hablar y desahogarse. Sin embargo, como tantas veces este año, Dios me sorprendió y te colocó en mi camino, alimentando estos temores y anhelos. Ese nombre lo leí en los artículos antes de viajar, cuya persona imaginé completamente diferente, hoy escribo en esta disertación, más específicamente en estas gracias, para agradecerles por cada momento juntas. Por estar a mi lado en Girona o Murcia, por los abrazos, risas, por entenderme incluso con mi horrible castellano, por los paseos capitalistas e impulsivos por el centro de Girona, por el asesoramiento científico, pero principalmente por apoyarme en todos los momentos. ¡Gracias por venir a mi vida!

El equipo de profesionales del *Research Center of Biotechnology of Animal and Human Reproduction* (TechnoSperm – Girona, Espanha): *Ariadna (Ari)*, *Marc (Jr.)*, *Sandra*, *Yentel*, *Beatriz (Bea)*, *Meritxell*, *Andra*, *Aina*, *Maria del Mar*, *Chiara*, *Samuel*, *Xavi*, *Juan*, *Jaime*, *Sebastian*, *Profa. Elizabeth Pinart*, y *Estela* en especial! Muchas gracias por la atención, cariño y cuidado. Gracias por probar mi idea de grupo, convivencia y parceria, y por toda la ayuda durante mis actividades. Vivir y trabajar cuatro meses de mi vida con vossostros, fuiste una gran experiencia e innumerables aprendizajes, tanto profesionales, culturales y personales. ¡Muchas gracias por todo cariño siempre!

A los profesores de la *Universidad Autónoma de Barcelona*, *Prof. Joan Enrique Rodríguez-Gil* y *Prof. Jordi Miro*, mi agradecimiento por la educación, atención y disponibilidad siempre.

*Ana*, *Tony*, *Aina*, *Eloi* y *Zak*, la familia que Dios me ha dado por tantos kilómetros. El núcleo al que podría llamar de familia. Que me sentí bienvenida, bien recibida y amada. Creo firmemente en los encuentros en nuestras diferentes vidas, y estoy segura de que fuiste una de las mejores pruebas de este hecho en mi vida. Gràcies, por permitirme ser parte de esta familia!

Ao *Programa de Pesquisa e Pós-Graduação em Reprodução Animal* (PPGRA-VRA) e a *Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia* da *Universidade de São Paulo* (FMVZ-USP) pela oportunidade do mestrado.

À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP) pelo apoio financeiro através da Bolsa de Mestrado no País (processo número 2017/10821-2) e pela possibilidade de intercâmbio através da Bolsa de Estágio e Pesquisa no Exterior - BEPE (processo número 2019/01124-1).

À *Banca Examinadora* desta dissertação, a qual agradeço pela disponibilidade de tempo tanto para leitura e atenção, como também por aceitarem nosso convite de avaliação deste projeto.

Acredito que o ato de agradecer, seja a quem for, é uma das formas de nos conectarmos com o que acreditamos como *divino*, independente da crença ou religião, cada uma das suas diferentes formas. E que este trata-se da mais pura expressão de amor que podemos dar às pessoas. Por isso, só tenho a dizer aos quais aqui me referi, que em cada um que me vem à mente, tenho meu coração repleto de gratidão, carinho e simplesmente amor por participarem da minha vida. Muito obrigada!

## *Epígrafe*

---

*“Per fer les coses bé cal: primer, l’amor a elles; segon, la técnica.”*  
*(“Para fazer as coisas bem é necessário: primeiro: o amor; segundo, a técnica.”)*

*(Antoni Gaudí, arquiteto catalão, 1852-1926)*

---

## RESUMO

PASSARELLI, M. S. **Avaliação dos efeitos dos tempos de equilíbrio nos protocolos de criopreservação do sêmen suíno: Um estudo fisiológico e morfofuncional.** [Evaluation of equilibration time on boar semen cryopreservation protocols: a physiological and morphofunctional study]. 2019. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

A criopreservação espermática é considerada como uma técnica de ampla aplicabilidade e eficiência para determinados sistemas de produção, que otimiza a produtividade e o melhoramento genético animal. Contudo, a sua utilização dentro da suinocultura mostra-se reduzida devido às singularidades dos espermatozoides desta espécie. Desta forma, uma série de estudos buscam por alternativas que melhorem o potencial fertilizante pós-descongelamento dos espermatozoides suínos, onde, uma opção que vem ganhando espaço nas pesquisas voltadas para a andrologia suína trata-se da aplicação do tempo de equilíbrio (TE) aos protocolos de criopreservação. O tempo de equilíbrio nada mais é do que o período ao qual os espermatozoides são mantidos em contato com os componentes do diluidor, à uma temperatura de 5°C, a fim de garantir um equilíbrio osmótico entre o meio intra e extracelular. Neste contexto, o presente trabalho objetivou validar o período ideal de TE, visando os melhores resultados pós-descongelamento do sêmen suíno, além de verificar os seus efeitos perante as características fisiológicas e morfofuncionais destas células. Pela primeira vez, os efeitos dos TE foram descritos e mostraram a importância das características de congelabilidade particular dos ejaculados suínos e dos parâmetros espermáticos avaliados. Onde, a motilidade espermática pós-descongelamento de ejaculados considerados como bons congeladores (GFE), mostrou-se melhor quando mantida após 2 horas de TE, e as integridades da membrana plasmática e acrossomal mostraram-se maiores quando em espermatozoides de ejaculados maus congeladores (PFE), são expostos aos mesmos TE. Foi observado também, que um TE prolongado de 4 h foi prejudicial para ambos os ejaculados, e que TE de 2h não mostrou efeitos prejudiciais em qualquer parâmetro espermático. Portanto, podemos concluir que a aplicação de TE de 2 h para ao final das curvas de refrigeração durante a criopreservação de espermatozoides suínos possui efeitos benéficos sobre a morfofisiologia destas células pós-descongelamento.

**Palavras-chave:** Criopreservação. Tempo de equilíbrio. Sêmen. Viabilidade. Suíno.



## ABSTRACT

PASSARELLI, M. S. **Evaluation of equilibration time on boar semen cryopreservation protocols: a physiological and morphofunctional study.** [Avaliação dos efeitos dos tempos de equilíbrio nos protocolos de criopreservação do sêmen suíno: Um estudo fisiológico e morfofuncional.]. 2019. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

Seminal cryopreservation is considered as a technique of broad applicability and efficiency for determinate production systems, which optimizes productivity and animal genetic improvement. However, its use within the swine industry is absent due to the singularities of the sperm of this species. Thus, several studies are searching for alternatives that improve the post-thawing performance of boar spermatozoa, where one option that has been gaining ground in research focused on boar andrology is the application of equilibration time (ET) to protocols of cryopreservation. Equilibration time is nothing more than the period at which spermatozoa are kept in contact with the extender components at a temperature of 5°C to ensure an osmotic balance between the intra and extracellular environment. In this context, the present study aimed to validate the ideal period of ET, aiming at the best post-thawing results of boar semen, besides verifying its effects on the physiological and morphofunctional characteristics of these cells. For the first time, the effects of ET were described and showed the importance of the particular freezing characteristics of boar ejaculates and the evaluated sperm parameters. Where, the post-thawing sperm motility of ejaculates considered as good freezers (GFE) was better when maintained after 2 hours of ET, and the plasma and acrosomal membrane integrity were higher when in poor freezer ejaculates (PEF) are exposed to the same ET. It was also observed that a prolonged 4 h ET was detrimental to both ejaculates and that 2 h ET showed no detrimental effects on any sperm parameter. Therefore, we can conclude that the application of 2 h ET to the end of the cooling curves during the boar sperm cryopreservation has beneficial effects on the post-thawing cell morphophysiology.

**Keywords:** Cryopreservation. Equilibration time. Semen. Viability. Boar.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representative scheme of the experiment performed to determine the best equilibration time in the boar sperm cryopreservation protocol using the Two-step methodology.....	71
Figura 2 -	Coleta de sêmen suíno através do "método da mão enluvada".....	72
Figura 3 -	Amostras diluídas em BTS e armazenadas em tubos de 50 mL, submetidas ao holding time (17°C) por 24 horas. Pode-se observar também a refrigeração do tubo que seria destinado a diluição da fração A, tal como a mesma mediante a temperatura de 17°C.....	72
Figura 4 -	Materiais utilizados para a curva de refrigeração e congelação (A) em refrigerador doméstico comum (B) até os 5°C e subsequentes aplicações dos tempos de equilíbrios.....	73
Figura 5 -	(A) Palhetas já envasadas destinadas ao porta-palhetas do sistema automático de criopreservação, e (B) amostras armazenadas em botijão criogênico à -196°C.....	73
Figura 6 -	Materiais utilizados para a realização da análise computadorizada da cinética espermática (CASA) .....	74
Figura 7 -	Mean $\pm$ standard deviation of treatment effects on total motility characteristic (TMOT%) of boar sperm.....	77
Figura 8 -	Mean $\pm$ standard deviation of treatment effects on boar sperm progressive motility (PMOT%).....	78
Figura 9 -	Mean $\pm$ standard deviation of the effects of equilibration times on the integrity of the acrosomal and plasma membrane (% PSA-/PI-) of boar sperm.....	79
Figura 10 -	. Mean $\pm$ standard deviation of the effects of equilibration times on boar plasma membrane lipid disorder (% M540-/YO-PRO-1-) .....	80
Figura 11 -	Mean $\pm$ standard deviation of the effects of equilibration times on lipid peroxidation in boar sperm plasma membrane (% BP-) .....	81

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mean $\pm$ standard deviation post-thaw sperm quality parameters according to the different classifications groups and their respective equilibration times.....	75
---	----

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
2. <b>CAPÍTULO I: Revisão de Literatura: “Os espermatozoides suínos e criopreservação: conceitos e particularidades”</b> .....	25
2.1.Sêmen criopreservado: sua aplicabilidade na suinocultura moderna.....	25
2.2.As membranas biológicas e o espermatozoide suíno.....	26
2.3.Eventos físico-químicos relacionados à criopreservação.....	28
2.4.O tempo de equilíbrio nos protocolos de criopreservação.....	30
2.5.Ejaculados bons e maus congeladores.....	32
3. <b>HIPÓTESE</b> .....	34
4. <b>OBJETIVOS</b> .....	36
5. <b>CAPÍTULO II: “Cryotolerance of boar spermatozoa is increased by the previous maintenance at 5°C for 2 hours”</b> .....	38
5.1.Introduction.....	40
5.2.Material and methods.....	41
5.2.1. <i>Animals and ethics</i> .....	41
5.2.2. <i>Experimental design</i> .....	42
5.2.3. <i>Semen collection and processing</i> .....	42
5.2.4. <i>Cryopreservation and semen thawing</i> .....	43
5.2.5. <i>Computer assisted sperm analysis (CASA)</i> .....	44
5.2.6. <i>Flow cytometry assays</i> .....	44
5.2.7. <i>Statistical analysis</i> .....	46
5.3.Results.....	47
5.3.1. <i>Computer assisted sperm analysis (CASA)</i> .....	47
5.3.2. <i>Flow cytometry</i> .....	47
5.3.2.1.Plasma and acrosome membrane integrity.....	47
5.3.2.2.Membrane lipid disorder.....	48
5.3.2.3.Mitochondrial potential membrane.....	48
5.3.2.4.Membrane lipid peroxidation and intracellular superoxide levels.....	48
5.4.Discussion.....	49
5.5.Conclusion.....	53
5.6.References.....	54

<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>64</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>83</b>

# INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de programas de inseminação artificial (IA) na suinocultura moderna, mostram-se como uma prática relativamente jovem para este sistema, cuja aplicabilidade tornou-se uma realidade apenas na década de 80. Mediante o desenvolvimento técnico e científico empregados sob esta produção, a IA revelou-se como uma técnica vantajosa devido a otimização da difusão genética aprimorada nesta espécie, contribuindo para o seu crescimento dentro do mercado de carne em âmbitos internacionais (KNOX, 2016). O sêmen suíno refrigerado, armazenado sob temperaturas entre 15 a 17°C, é a forma mais utilizada nos protocolos de IA, devido aos resultados obtidos, a partir do seu alto desempenho reprodutivo, com taxas de partos superiores a 90% e tamanhos de leitegadas maiores ou iguais a até 12 leitões nascidos vivos (RODRÍGUEZ-GIL; ESTRADA, 2013).

Apesar de sua ampla aplicabilidade para algumas espécies, o sucesso na técnica de criopreservação espermática ainda é um dos grandes desafios dentro do sistema de produção de suínos, devido ao número significativo de alterações estruturais e conseqüentemente fisiológicas nestas células. Podemos citar como exemplos das lesões ocasionadas a perda na integridade da membrana plasmática; a degeneração acrossomal; comprometimento da atividade metabólica celular; estresse oxidativo; alterações na funcionalidade das proteínas de membranas; danos estruturais na cromatina; e queda na motilidade pós-descongelamento. Tais alterações, acarretam no comprometimento do transporte espermático, na sua capacidade de sobrevivência no aparelho reprodutivo feminino, no reconhecimento e ligação aos receptores de membrana, e até mesmo complicações no desenvolvimento embrionário, levando conseqüentemente a uma redução nos índices de fertilidade e número de leitões nascidos por fêmea (JOHNSON, 1998; GONÇALVES et al., 2008).

Técnicas diversas foram desenvolvidas e aplicadas nas últimas décadas com o objetivo de melhorar a congelabilidade do sêmen suíno, como desde a retirada e/ou a adição de plasma seminal (SARAVIA et al., 2009; GÓMEZ-FERNÁNDEZ et al., 2012; FERNÁNDEZ-GADO et al., 2013; TORRES et al., 2016), a adição de antioxidantes (YESTE et al., 2014), a alteração nos protocolos de criopreservação (HOLT et al., 2005; HERNÁNDEZ et al., 2007; PEÑA et al., 2007; BAISHA et al., 2014; TORRES et al., 2019), o uso de frações específicas do ejaculado (SARAVIA et al., 2010; VILAGRAN et al., 2015) e o uso do *holding time* (CASAS; ALTHOUSE, 2013; TOMÁS et al., 2014).

Dentre os fatores considerados como estressantes para os espermatozoides, o choque térmico pelo frio, a fase de transição dos fosfolípidios de membrana, o estresse osmótico, a

toxicidade pela adição de crioprotetores, além da desidratação decorrente do processo de congelação, são alguns dos pontos críticos deste processo (GONÇALVES et al., 2008). Para o seu sucesso e a conseqüente preservação da arquitetura espermáticas após a descongelação, faz-se necessário a presença de fatores considerados como importantes, como a escolha do diluidor - e conseqüentemente do crioprotetor - as curvas de refrigeração, congelação e descongelação, onde, quando todos estes associados de forma correta, podem minimizar os danos causados pelo choque frio, tal como a formação de cristais de gelo e a desidratação celular (AMANN, 1987; CELEGHINI, 2005).

De acordo com Salamon e Maxwell (2000), o tempo de equilíbrio trata-se de um período ao qual os espermatozoides são mantidos em contato com todos os componentes do diluidor, especialmente os crioprotetores, previamente a congelação, à uma temperatura de 5°C. Tal contato, garantiria um equilíbrio osmótico entre o meio intracelular espermático com o meio extracelular, formado por todos os componentes osmoticamente ativos presentes no diluidor.

Para o suíno, a aplicação dos tempos de equilíbrio por sua vez, é conduzida de uma forma diferente das demais. Desta forma, este período deve ser aplicado juntamente a um diluidor à base de lactose-gema de ovo inicialmente, livre de glicerol, garantindo que os espermatozoides não sejam expostos aos efeitos tóxicos desta molécula (FULLER, 2004; MACIAS GARCIA et al., 2012; SIEME et al., 2016).

Uma série de estudos e pesquisas relacionados ao tempo de equilíbrio foram realizados nas diferentes espécies, onde baseara-se em diversas análises que avaliaram os efeitos do tempo de equilíbrio. Entretanto, até o presente momento, observações relacionadas a avaliações mais complexas não foram avaliadas, com relação a aplicação de tal técnica ao processo de criopreservação do sêmen suíno.

Perante os desafios apresentados para a execução de uma técnica de criopreservação efetiva para a espécie suína, a aplicação de um tempo de equilíbrio (TE) eficaz, alternativo daqueles já estudados para a espécie em questão, e que garanta uma melhor viabilidade da célula espermática, será o foco do presente estudo.



# CAPÍTULO I

## REVISÃO DE LITERATURA:

*Os espermatozoides suínos e criopreservação:  
conceitos e particularidades*

---

## **2. CAPÍTULO I: Revisão de Literatura: *Os espermatozoides suínos e criopreservação: conceitos e particularidades***

### *2.1. Sêmen criopreservado: sua aplicabilidade na suinocultura moderna*

O sucesso dos programas de inseminação artificial (IA) na suinocultura trata-se de uma prática relativamente recente, especialmente quando comparada aos demais sistemas de produção. Os primeiros experimentos que objetivaram testar a eficiência da IA em suínos, iniciaram-se na Rússia no início do século XX (IVANOW, 1907), contudo, sua aplicação comercial iniciou-se apenas na década de 80 (RODRÍGUEZ-GIL; ESTRADA, 2013). Dois fatores foram fundamentais para a mudança neste cenário produtivo: primeiro, o desenvolvimento de um diluidor com maior disponibilidade de tempo para a prática de IA, uma vez que este aumentava a vida útil dos espermatozoides armazenados sob temperaturas entre 15 e 17°C (PURSEL; JOHNSON, 1975); e segundo, a padronização da técnica entre os produtores suínos, o que permitiu o sistema se tornar economicamente ativo e rentável perante os aspectos comerciais (JOHNSON et al., 2000).

Desde então, devido ao desenvolvimento tecnológico e científico empregado sob a suinocultura, a aplicação das IAs proporcionou uma série de vantagens. Um exemplo, trata-se do número de machos reprodutores ativos dentro das granjas, cuja redução, permitiu um maior aproveitamento das instalações, maiores economias mediante os gastos financeiros de manter estes animais, e principalmente, o início da produção de um número significativo de doses seminais, permitindo a cobertura de um maior número de fêmeas, a partir de um único ejaculado. Desta forma, a otimização da difusão genética, aprimorada nesta espécie, possibilitou atender de forma direta, às demandas do mercado de carne mundial. Além disso, a produção de doses inseminantes permitiu um melhor controle sanitário dentro das unidades produtivas, garantindo, juntamente a outros aspectos, uma biossegurança de sucesso (RODRÍGUEZ-GIL; ESTRADA, 2013).

A implementação do sêmen criopreservado dentro dos programas de IA em determinadas espécies domésticas, obteve sucesso devido aos resultados alcançados sob os aspectos de fertilidade e prolificidade. Contudo, para a espécie suína, trata-se de um ponto ainda falho, o que torna a sua aplicabilidade ainda muito restrita. Os resultados encontrados, mostram-se claramente abaixo daqueles obtidos por IAs realizadas com sêmen refrigerado (MARTÍNEZ et al., 2002). Assim, enquanto a fertilidade média com sêmen refrigerado pode ser definida em

uma percentagem igual ou acima de 90%, a fertilidade com o uso de sêmen criopreservado, geralmente atinge valores de cerca de 80%. Desta forma, tendo em vista que para a produção suinícola a obtenção de um número máximo de leitões trata-se do objetivo principal, é compreensível a não adoção desta técnica junto aos programas de IA, que passa a ser considerada uma técnica não rentável para a suinocultura (CASAS et al. 2010).

No entanto, o sêmen criopreservado possui várias indicações e um importante papel dentro do cenário agropecuário. Primeiramente, a criopreservação de gametas permite o armazenamento de todo o mapeamento genético de um determinado indivíduo, raça ou linhagem, por um período de tempo maior que sua expectativa de vida. A criação destes bancos de germoplasma, permite que produtores tenham acesso aos genótipos, e consequentemente aos fenótipos de interesse, mediante os objetivos do seu sistema de produção. A segunda razão de interesse, constitui-se de uma base sanitária, onde o armazenamento e a comercialização de sêmen criopreservado oferece uma garantia de que, no caso de epidemias que obriguem a eliminação de rebanhos inteiros, a informação genética esteja salva, evitando assim a perda completa deste recurso de maior valor, sendo possível o seu transporte por todo o mundo com máxima segurança (RODRÍGUEZ-GIL; ESTRADA, 2013).

Como já apresentado, apesar de amplamente dominada para algumas espécies, o sucesso na técnica de criopreservação seminal ainda é um dos grandes desafios dentro da suinocultura, devido ao número significativo de alterações estruturais e consequentemente fisiológicas observadas na célula espermática, o que leva aos resultados indesejáveis citados. Assim, uma melhor compreensão e entendimento dos motivos os quais dificultam este processamento, foram e ainda estão sendo estudados (JOHNSON, 1998).

## *2.2.As membranas biológicas e o espermatozoide suíno*

Uma gama de macromoléculas são responsáveis pela construção das biomembranas, garantindo o desempenho das suas funções básicas e vitais para a sobrevivência dos seres vivos. Neste caso, considerando os lipídios como os componentes primários e de maior presença nestas unidades funcionais, estes apresentam uma distribuição assimétrica por toda a bicamada, como sugerido no modelo proposto por Singer e Nicholson em 1972, cujos tipos são inúmeros, distinguindo-se uns dos outros mediante suas estruturas químicas. Os fosfolipídios, tratam-se da classe de lipídios mais abundantes, podendo contar com três subtipos básicos: as fosfatidilcolinas, as fosfatidiletanolaminas e as fosfatidilserinas. Os esfingolipídios por sua vez,

contam como membro principal as esfingomielinas; enquanto que os glicolipídios e o colesterol, possuem também processos fisiológicos fundamentais para os mecanismos sinalizadores executados pelos diferentes tipos celulares (NELSON; COX, 2014).

As propriedades físicas dos ácidos graxos, então presentes na composição dos diferentes lipídios de membrana, são determinadas em grande parte pelo comprimento de sua cadeia hidrocarbonada, influenciando de forma significativa na temperatura de fusão dos mesmos. Os distintos pontos de fusão dos diferentes ácidos graxos – relacionando-se ao comprimento das cadeias - se dá principalmente devido a justaposição de tais moléculas, devido a ação da força de Van der Waals. Sendo assim, quanto menor o tamanho da cadeia hidrocarbonada, maior será a quantidade de energia térmica aplicada para garantir a quebra desta força, tal como sua desorganização, resultando em uma elevada temperatura de fusão (ALBERTS et al., 2010).

Nos casos de presença de ligações duplas nas cadeias hidrocarbonadas - que lhe conferem característica de insaturação -, estas também levam a influência na temperatura de fusão dos ácidos graxos. As duplas ligações não permitem a justaposição de tais moléculas, sendo a interação entre estas fraca, sendo por este motivo que a quantidade de energia térmica aplicada, para garantir a desorganização dessa estrutura, será menor. Ou seja, quanto maior o grau de insaturação, menor será a temperatura de fusão (ALBERTS et al., 2010; NELSON; COX, 2014). Assim, com as quedas de temperatura, os lipídios de mesma sensibilidade se agrupam, de forma irreversível, formando as denominadas “balsas lipídicas”, comprometendo desta forma a seletividade e a permeabilidade das membranas biológicas (DE LEEUW et al., 1990; WATSON, 2000).

Já o colesterol, molécula esta fundamental para garantir a estabilidade e a rigidez das biomembranas, encontra-se comumente posicionado entre dois fosfolipídios, mais especificamente, entre as porções apolares da estrutura, o que garante uma menor interação entre tais caudas hidrofóbicas, reduzindo assim a fluidez da membrana quando em temperaturas fisiológicas, afetando as temperaturas de transição das membranas e tornando estas ainda maiores (WATSON, 2000; NELSON; COX, 2014).

Os espermatozoides suínos possuem particularidades com relação a arquitetura de sua membrana plasmática. Em tal espécie as diferentes concentrações dos seus distintos componentes, justificam a complexidade de sua fisiologia e os obstáculos para a sua criopreservação (PARKS; LYNCH, 1992).

Dentre tais componentes, os espermatozoides suínos possuem baixas concentrações de fosfatidilcolina, e altas percentagens de fosfatidiletanolamina e esfingomielina, lipídios estes considerados com alto grau de insaturação (JOHNSON et al., 2000). O colesterol por sua vez,

componente este representado de forma reduzida na membrana espermática da espécie suína (0,12, enquanto que em bovinos e ovinos sua composição pode ser relativa a 0,38 e 0,36 respectivamente), influência de forma significativa na formação das “balsas lipídicas”, o que torna os espermatozoides neste caso, mais sensíveis as diferenças de temperatura as quais serão submetidos, ou ao também denominado “choque frio” (DE LEEUW et al., 1990).

Mediante estas suscetíveis desestabilizações da membrana plasmática dos espermatozoides suínos, prontamente estes perdem sua permeabilidade seletiva, permitindo que moléculas de cálcio, bicarbonato, dentre outros componentes do meio em que se encontram, entrem nestas células, interrompendo a homeostase, além de facilitar a degradação de proteínas e mRNAs (JOHNSON et al., 2000; BAILEY et al., 2008; CHEN et al., 2014; ZENG et al., 2014). Os danos na membrana afetam ainda a capacidade destas células se ligarem às células epiteliais da junção útero-tubárica e do istmo, que são necessárias para estabelecer o reservatório de espermatozoides no aparelho reprodutivo das fêmeas suínas, como para o reconhecimento dos receptores de membranas presentes nos oócitos, afim de garantirem o sucesso da fertilização (KNOX, 2015).

Alterações de temperatura podem também modificar a localização das chamadas nucleoproteínas, como protaminas e histonas, e romper suas pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína das protaminas das células espermáticas nesta espécie (FLORES et al., 2011; YESTE et al., 2013). Os efeitos prejudiciais sobre o núcleo dos espermatozoides, podem ajudar a explicar as taxas mais baixas de fertilização destas células quando criopreservadas e descongeladas, ao se avaliar as taxas de fertilização, tal como as taxas partos e o tamanho de leitegadas nascidas a partir de inseminações artificiais realizadas com sêmen criopreservado (ESTRADA et al., 2014).

### *2.3.Eventos físico-químicos relacionados à criopreservação*

Ao avaliar-se qual o principal desafio enfrentado pela célula espermática durante o processo de criopreservação, este não se encontra relacionado a sua habilidade em resistir à temperatura de armazenamento à -196°C, mas sim, na sua capacidade de suportar as mudanças às quais será submetida: tanto ao longo do processo de criopreservação, como durante a descongelação (MAZUR, 1984).

Para a aplicação de tal biotecnologia de armazenamento, os espermatozoides devem ser inicialmente submetidos a uma redução gradual de temperatura, afim de não causar danos imediatos a sua estruturação. Desta forma, a diluição dos mesmo em meios apropriados e o seu destino a curva de refrigeração, são medidas necessárias a serem empregadas, como preparações iniciais para tal processo. Contudo, alterações fisiológicas e estruturais podem ocorrer mesmo mediante estes cuidados, considerando especialmente as temperaturas entre 20 a 5°C. Tais alterações são consideradas como severas, uma vez que os diferentes fosfolipídios de membrana, que tendem a passar por uma fase de transição - do seu estado líquido para o estado gel -, agrupam-se de forma irreversível, originando as chamadas “balsas lipídicas”, que nada mais são do que o agrupamento entre fosfolipídios de um mesmo tipo, que tendem a se unir mediante suas respectivas temperaturas de transição (MORAN, 1992; GRAHAM, 1996).

Nas temperaturas abaixo de 5°C, o meio o qual os espermatozoides se encontram, tal como as próprias células, permanecem descongelados, ocorrendo apenas uma super refrigeração de tais unidades celulares (MAZUR, 1984; AMANN; PICKETT, 1987). Quando em temperaturas entre -5 a -15°C, a água, presente no meio extracelular, inicia a sua solidificação e a concentração de soluto tende a aumentar conseqüentemente.

Em condições normais e consideradas como adequadas, a perda de água do interior das células para o meio extracelular - mediante uma curva de refrigeração em uma velocidade intermediária-, visa atender a lei de osmolaridade, ou seja, garantir um equilíbrio osmótico entre o meio intra e extracelular, mediante a saída de solução do meio hiposmótico para o meio hiperosmótico, acarretando a não formação de cristais de gelo no interior da célula (MAZUR, 1984). Considerando as condições adequadas, quando uma solução é refrigerada abaixo do seu ponto de congelamento, a água pura se cristaliza (GRAHAM, 1996; NEILD et al., 2002; MEYERS et al., 2003), e os solutos na fração de água líquida remanescente aumentam a pressão osmótica no espaço extracelular. Com isso, mesmo à -196°C ainda há a existência de canais de água descongelada, contendo concentrações de sais extremamente altas, residindo nestes os espermatozoides que sobrevivem a criopreservação (AMANN; PICKETT, 1987; AMANN; GRAHAM, 1992).

Já em condições adversas, como em curvas de refrigeração rápidas, a água presente no interior dos espermatozoides, sofre uma alteração no seu estado físico, a partir da sua solidificação e conseqüente transformação em cristais de gelo de forma abrupta, sem condições de obedecer a lei de osmolaridade. A extensão dos danos causados pelo gelo intracelular depende do grau de formação do mesmo e o tamanho dos seus cristais. Quando grandes, podem causar danos mecânicos, sendo uma das principais causas de morte celular durante a

criopreservação, enquanto que pequenos cristais podem não ser deletérios (MAZUR, 1984). Nas curvas de refrigeração extremamente lentas por sua vez, os espermatozoides tendem a desidratar demasiadamente, devido a este longo período de exposição térmica (AMANN; PICKETT, 1987).

Como apresentado inicialmente, segundo bases físico-químicas, as lesões celulares são causadas durante os processos de congelação e descongelação. Isto devido à formação de cristais de gelo no seu interior, ou a desidratação demasiada, que compromete os processos posteriores de reidratação celular, e acarretam a um comprometimento da arquitetura celular, além do deslocamento e desnaturação de proteínas, tal como o desarranjo estrutural do citoesqueleto, e lise celular decorrente do desequilíbrio eletrolítico (WATSON, 2000; O'CONNELL et al., 2002; BOLLWEIN et al., 2008).

#### *2.4.O tempo de equilíbrio nos protocolos de criopreservação*

O tempo de equilíbrio consiste no período total em que os espermatozoides são mantidos em contato com todos os componentes do diluidor, especialmente os crioprotetores penetrantes, previamente a congelação, à uma temperatura de 5°C, afim de garantir um equilíbrio osmótico entre o meio intra e extracelular (SALAMON; MAXWELL, 2000).

Desde a década de 1950 o tempo de equilíbrio vem sendo estudado como um método alternativo, cujo principal objetivo é auxiliar no sucesso do processo de criopreservação espermática, visando melhores resultados pós-descongelação (POLGE; ROWSON, 1952; MILLER; VANDEMARK, 1954). Tal alternativa de complementação dos protocolos de criopreservação, vindo sendo aplicada nas mais diferentes espécies, como em bovinos (LEITE et al., 2010; ALMEIDA et al., 2017; GURLER et al., 2018; MURPHY et al., 2018), bubalinos (SHAHVERDI et al., 2014) equinos (JIMENEZ et al., 1987; BRISKO et al., 2000; PUGLIESI et al., 2012), suínos (YI et al., 2002; CASAS; ALTHOUSE, 2013; SCHAFER et al., 2017), caprinos (DUTTA et al., 1996; PRADEE et al., 2014) e cães (DU BOIS et al., 2012; BELALA et al., 2016), como também em espécies de vida selvagem e aquática (LÓPES-UREÑA et al., 2014; LIU et al., 2018; VIYAKARN et al., 2018).

Inicialmente, vários pontos de vista foram defendidos com relação a aplicação dos tempos de equilíbrio, nos protocolos de criopreservação de diferentes espécies, sendo atualmente uma etapa considerada como importante para os bons resultados de viabilidade espermática. Para

alguns autores, a manutenção dos espermatozoides à 5°C por longos períodos, garante uma melhora na motilidade da célula espermática pós-descongelamento, quando comparado a curtos períodos de exposição aos crioprotetores. Isto porque, acreditava-se que quanto maior a exposição da célula a tais componentes, maior o efeito que estes teriam sobre ela, evitando assim danos indesejáveis e irreversíveis (CRAGLE et al., 1955; MARTIN, 1963). Em contrapartida, outros autores acreditavam que o contrário seria a realidade deste então novo método: Longos períodos aos quais as células fossem submetidas a esta exposição, não garantiriam uma proteção as lesões futuras da criopreservação (MILLER; VANDEMARK, 1954).

Na espécie suína, mediante seus diversos obstáculos para a obtenção de resultados satisfatórios pós-descongelamento, uma série de trabalhos já buscaram por resultados positivos com a aplicação do tempo de equilíbrio, devido justamente aos desafios característicos da espécie. Contudo, ante tais particularidades, foi observado que a aplicação dos tempos de equilíbrio para esta espécie deveria ser conduzida de uma forma diferente das demais. Desta forma, assume-se que este período deve ser empregado para a espécie em questão sob um diluidor inicial livre de glicerol, e não em um meio de criopreservação comumente utilizado, composto por uma concentração final de 2 a 3% de glicerol, garantindo assim que os espermatozoides não sejam expostos aos efeitos tóxicos desta molécula (FULLER, 2004; MACIAS GARCIA et al., 2012; SIEME et al., 2016).

Baseando-se nas baixas concentrações de glicerol (2%), estudos demonstram que os tempos de equilíbrio considerados como curtos, relativos a 2 horas, podem garantir a adaptação da membrana espermática de espermatozoides suínos, garantindo uma maior tolerância desta barreira física aos estresses térmicos aos quais estará sujeita, ao considerar os parâmetros de motilidade espermática e morfologia acrossomal (YI et al., 2002).

Em 2013, Casas e Althouse demonstraram que a exposição dos espermatozoides ao seu próprio plasma seminal sob períodos relativos a 24 horas (*holding time*), minimizaram as alterações comumente visíveis nos casos de criopreservação, quando associados a permanência sob 5°C, considerando dois diferentes tempos de equilíbrio (3 e 24 horas), e diluídos em meios a base de lactose-gema de ovo, desprovidos de glicerol (meio LEY). A manutenção da integridade de membrana tal como a redução nos níveis de fluidez da mesma, foram observadas pós-descongelamento, onde acredita-se que estas células não sofreram integralmente com o estresse osmótico.

Já os efeitos de curtos e longos tempos de equilíbrio (2 e 4 horas; 24 e 48 horas respectivamente), foram testados por Schafer e colaboradores (2017), que a partir das análises



de cinética espermática (sistema CASA), tal como a viabilidade celular por citometria de fluxo (atividade mitocondrial, integridade de membranas plasmática e acrossomal, e estruturação da cromatina), observaram que mais uma vez, os tempos de equilíbrio influenciaram positivamente na qualidade pós descongelação, cujo período de equilíbrio de 4 horas demonstrou os melhores resultados.

Tempos de equilíbrio menores são considerados de maior praticidade perante o processo de criopreservação, podendo ser suficientes para promoverem um equilíbrio osmótico adequado e melhores resultados pós-descongelamento do sêmen suíno, tal como já apresentado. Neste caso, a avaliação de tais períodos para tempos de equilíbrio, objetivando uma melhora significativa no quesito qualitativo, visa responder a uma gama de perguntas relacionadas ao aspecto biotecnológico da criopreservação espermática suína, como também buscar novas alternativas para a possibilidade de futuras aplicações de tal técnica de forma comercial.

Sendo assim, o artigo apresentado na sequência buscou elucidar a aplicação do tempo de equilíbrio nos protocolos de criopreservação do sêmen suíno, atendendo a compreensão do efeito deste perante os seus aspectos fisiológicos e morfuncionais, relacionados a integridade da membrana plasmática.

### *2.5. Ejaculados bons e maus congeladores*

A partir das características particulares da membrana plasmática, em suínos observou-se a capacidade de criotolerância dos espermatozoides de determinados ejaculados, o que permitiu a classificação dos mesmo em bons (GFE) e maus congeladores (PFE) (WATERHOUSE et al., 2006; CASA et al., 2009).

A identificação dos chamados marcadores de congelabilidade do ejaculado suíno, buscaram compreender as respostas celulares aos estresses osmóticos e térmicos ocorrentes durante a criopreservação, contudo, seus mecanismos exatos ainda apresentam dúvidas quanto a sua complexa atuação (YESTE, 2016). A abundância de determinadas proteínas plasmáticas, como a proteína de choque térmico 90-KDa alfa A1 (*heat shock protein* – HSP90AA1), proteína de ligação à acrosina (ACRBP), o triosefosfato isomerase (TPI) e tal como a proteína de canal iônico voltagem-dependente 2 (VDAC2) no sêmen *in natura*, apresentaram-se como os fatores diferenciais da qualidade dos ejaculados quanto a sua congelabilidade (CASAS et al., 2010; VILAGRAN et al., 2013, 2014). Além disso, a atividade de enzimas específicas como a

acrosina, em espermatozoides *in natura*, também se mostraram ligadas à sua resiliência ao processo de criopreservação (ESTRADA et al., 2015; PINART et al., 2015).

# HIPÓTESE

---

### **3. HIPÓTESE**

Diante do exposto, baseado nos resultados advindos da literatura e em conjunto com a ausência de algumas informações e trabalhos científicos em temas específicos, a hipótese deste trabalho é de que a aplicação do tempo de equilíbrio aos protocolos de criopreservação do sêmen suíno, em ejaculados classificados como maus congeladores influencia de forma positiva na qualidade e na viabilidade espermática, enquanto que aqueles classificados como bons congeladores, não sofrerão alterações quanto as suas características.

# OBJETIVOS

---

#### **4. OBJETIVOS**

Com base na literatura apresentada e na hipótese estabelecida, o presente estudo buscou alcançar os seguintes objetivos:

- a) Determinar o período ideal de tempo de equilíbrio, visando os melhores resultados pós-descongelamento do sêmen suíno;
- b) Avaliar a importância da sua aplicação nos protocolos de criopreservação em ejaculados classificados como bons e maus congeladores, afim de garantir melhorias na qualidade e na viabilidade espermática;
- c) Verificar a atuação do tempo de equilíbrio perante as características de cinética espermática, integridade das membranas plasmática e acrossomal, avaliação quanto a atividade mitocondrial; peroxidação e fluidez da membrana plasmática, além dos níveis de estresse oxidativo intracitoplasmático.

# CAPÍTULO II:

*“Cryotolerance of boar spermatozoa is increased by  
previous maintenance at 5°C for 2 hours.”*

---

## 5. CAPÍTULO II: ARTIGO

### 1 **Title**

2 Cryotolerance of boar spermatozoa is increased by previous maintenance at 5°C for 2  
3 hours

### 4 **Authors**

5 Marina da Silva Passarelli <sup>a</sup>, Ana Paula Pinoti Pavaneli <sup>a</sup>, Gisele Mouro Ravagnani <sup>a</sup>,  
6 Matheus Pasini Martins <sup>a</sup>, Ana Carolina Pedrosa <sup>a</sup>, Simone Maria Massami Kitamura  
7 Martins <sup>a</sup>, Nathalia Raissa de Alcântara Rocha<sup>b</sup>, Victor Henrique Bittar Rigo <sup>a</sup>, George  
8 Yasuib, Marc Yeste<sup>c</sup>, André Furugen Cesar de Andrade <sup>a\*</sup>

### 9 **Affiliations**

10 <sup>a</sup>Laboratory of Andrology and Technology of Swine Embryos, Department of Animal  
11 Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São  
12 Paulo, Pirassununga, São Paulo, Brazil.

13 <sup>b</sup>Laboratory of Biotechnology of Fishs (CEPTA/ICMBio), Pirassununga, São Paulo,  
14 Brazil.

15 <sup>c</sup>Biotechnology of Animal and Human Reproduction (TechnoSperm), Unit of Cell  
16 Biology, Department of Biology, Institute of Food and Agricultural Technology, Faculty  
17 of Sciences, University of Girona, Girona, Spain.

### 18 **\*Corresponding author**

19 André Furugen Cesar de Andrade, Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina  
20 Veterinária e Zootecnia, Departamento de Reprodução Animal, Avenida Duque de  
21 Caxias Norte, 225, Jardim Elite, campus Fernando Costa – USP, Pirassununga, São Paulo,  
22 Brazil

23 Tel. +55 11 97400-1272 e-mail: [andrefc@usp.br](mailto:andrefc@usp.br)

24



**Abstract**

Equilibration time is nothing more than the period at which spermatozoa are kept in contact with the extender components at a temperature of 5°C to ensure an osmotic balance between the intra and extracellular environment. In this context, the present study aimed to validate the ideal period of ET, aiming at the best post-thawing results of boar semen, besides verifying its effects on the physiological and morphofunctional characteristics of these cells. For the first time, the effects of ET were described and showed the importance of the particular freezing characteristics of boar ejaculates and the evaluated sperm parameters. Where, the post-thawing sperm motility of ejaculates considered as good freezers (GFE) was better when maintained after 2 hours of ET, and the plasma and acrosomal membrane integrity were higher when in poor freezer ejaculates (PEF) are exposed to the same ET. It was also observed that a prolonged 4 h ET was detrimental to both ejaculates, and that 2 h ET showed no detrimental effects on any sperm parameter. Therefore, we can conclude that the application of 2 h ET to the end of the cooling curves during the boar sperm cryopreservation has beneficial effects on the post-thawing cell morphophysiology.

41

**Keywords:** Cryopreservation, equilibration time, semen, viability, boar

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

## 53        **5.1.Introduction**

54        Gamete cryopreservation is one of the most effective methods for long-term storage.  
55        While, in some species, such as the bull, Artificial Insemination (AI) is conducted with  
56        frozen-thawed sperm, its use for pig breeding is scarce due to cryoinjuries that are  
57        inflicted during this process [1,2]. Amongst other detrimental impacts, sperm  
58        cryopreservation reduces sperm motility, acrosome and plasma membrane integrity,  
59        decreases mitochondrial activity and the integrity of sperm nucleus and compromises  
60        sperm fertilizing ability [3, 4, 5, 6, 7].

61        Over the last two decades, different attempts have been made to optimize  
62        cryopreservation protocols in boar semen, all aiming at increasing post-thaw sperm  
63        quality and thus reproductive performance [8, 9, 10]. Among these approaches, the study  
64        of the effects of a prolonged holding time, which is the period during which boar semen  
65        is maintained at 15-17°C prior to cryopreservation, has revealed that it is crucial for boar  
66        sperm to increase their cryopreservation [11, 12]. Other attempts involved the use of sperm  
67        selection methods through density gradient, the use of a specific colloid for boar sperm  
68        (Androcoll-P-Swedish University of Agricultural Science, Uppsala, Sweden) being found  
69        to remove non-functional cells and thus to increase post-thaw sperm quality [13].  
70        Furthermore, optimizing sperm packaging in 0.5-mL straws [14, 15, 16] as well as cooling  
71        and freezing curves have also been found to increase sperm cryotolerance [17, 18, 19].

72        In spite of all the aforementioned, less attention has been paid to the relevance of  
73        equilibration time (ET), which is the time over which sperm are kept at 5°C prior to  
74        starting the freezing rate. During that time, sperm are contact with non-permeable  
75        cryoprotectants, such as egg yolk and lactose, which are the two main components of  
76        LEY medium. At the end of this equilibration time, glycerol is added, sperm are packed  
77        and the freezing curve starts. Although one may hypothesize that the duration of

78 equilibration time could affect sperm cryotolerance, as the osmotically active components  
79 of cooling media are relevant for the adaptation of sperm to freezing conditions [20, 21,  
80 22, 23], no previous study has evaluated the actual impact of that period.

81 On the other hand, it has been extensively reported that great differences between  
82 boars and ejaculates from the same boar exist in terms of cryotolerance [24, 17, 7]. This  
83 involves that despite the sperm quality of two given ejaculates being good as fresh semen,  
84 they may greatly differ at post-thaw. For this reason, boar ejaculates are classified as good  
85 freezability ejaculates (GFE) or poor freezability ejaculates (PFE), based on their post-  
86 thaw sperm motility and functionality [7]. While, at present, the mechanisms underlying  
87 these individual differences are not fully understood, any study aiming at improving  
88 sperm cryopreservation protocols needs to contemplate the existence of good and poor  
89 freezability ejaculates.

90 Thus, the present study aimed to determine the effects of the equilibration time on  
91 sperm quality at post-thaw, taking into consideration that such effects may differ between  
92 GFE and PFE. This research may contribute to optimize sperm cryopreservation protocols  
93 and may also shed light onto the mechanisms underlying boar sperm cryotolerance.

94

## 95 **5.2. Material and methods**

### 96 *5.2.1. Animals and ethics*

97 A total of five commercial hybrid boars (LM6200<sup>®</sup>) of proven fertility were used  
98 (DB<sup>®</sup> Genética Suína; Patos de Minas, Brazil). All animals were housed at the Swine  
99 Production of Campus Fernando Costa, *Faculty of Animal Science and Food Engineering*  
100 (University of São Paulo, FZEA/USP; Pirassununga, Brazil) and were fed a standard,  
101 balanced diet.

102 All experimental procedures followed the legal and ethical standards of the Ethics  
103 Committee on the Use of Animals, School of Veterinary Medicine and Animal Science,  
104 University of São Paulo. This study was approved by the aforementioned Committee  
105 (authorization code: 8215250417).

106

#### 107 *5.2.2. Experimental design*

108 The experiment was designed as randomized blocks, where each boar was considered  
109 as a block, and the experimental unit was each ejaculate maintained at three different  
110 equilibration times (ET: 0 h, 2 h or 4 h). As stated above, samples were collected from  
111 five separate boars and each boar was collected four times (N=20 ejaculates). Upon  
112 arrival at the laboratory, each ejaculate was checked for sperm quality and then split into  
113 three parts, that were exposed to different equilibration times (0 h, 2 h or 4 h) upon  
114 completion of cooling curve to 5°C and immediately before sperm packing and freezing  
115 to -196°C. Therefore, a total of 60 samples (i.e. 20 ejaculates × 3 equilibration times) were  
116 cryopreserved.

117 One month after cryopreservation, four straws of each cryopreserved sperm sample  
118 were thawed and its sperm motility, morphometry and other sperm function parameters  
119 were evaluated through CASA and flow cytometry. Figure 1 shows the experimental  
120 design of this study.

121

#### 122 *5.2.3. Semen collection and processing*

123 Sperm-rich fractions of five boars were collected four times through the gloved-hand  
124 technique (n=20). Immediately after collection, the volume was determined and samples  
125 were held at room temperature (20-24°C) for 30 min in its own seminal plasma. Next,  
126 samples were diluted 1:4 (v:v) in Beltsville Thawing Solution (BTS) [25] and then split

127 into 50-mL tubes. One aliquot of diluted semen was taken to evaluate sperm concentration  
128 (Neubauer chamber), and motility (Computer-Assisted Sperm Analysis, SCA  
129 Ver.5.2.0.1, 2010; Microptics<sup>®</sup>, Barcelona, Spain). Following this, samples were cooled  
130 down to 17°C, then maintained at 17°C for 24 h (holding time), and finally cryopreserved  
131 [11, 12].

132

#### 133 *5.2.4. Cryopreservation and semen thawing*

134 Samples in 50-mL tubes were centrifuged at room temperature (2200 x g/3 min), and  
135 sperm pellets were separated from the supernatant, and resuspended in with Lactose Egg  
136 Yolk freezing medium (LEY; BotuSui Fração A, Botupharma, Botucatu-SP) at a final  
137 concentration of  $1.5 \times 10^9$  spermatozoa/mL. The final volume was split into three different  
138 aliquots that were submitted to different equilibration times (ET; 0 h, 2 h and 4 h).  
139 Samples were cooled down to 5°C in a cooling cabinet. When samples reached the  
140 temperature of 5°C, they were either processed for the next step (ET: 0 h) or held at that  
141 temperature for 2 h or 4 h. The next step consisted of further dilution with BotuSui Fração  
142 B (LEYGO; Botupharma, Botucatu-SP), a freezing medium that contains 2% glycerol  
143 and 2% methylformamide, to a final concentration of  $1 \times 10^9$  spermatozoa/mL. Samples  
144 were packed into 0.5 mL straws (IMV Technologies; L'Aigle, France). Straws were  
145 cryopreserved using a short-cryopreservation protocol, following the protocol described  
146 by Torres et al. [26, 27]. The freezing curve from 5°C to -120°C was -20°C/min, using a  
147 controlled-rate freezer (TK 3000<sup>®</sup>; TK Tecnologia em Congelação Ltda., Uberaba-  
148 Brazil). Samples were finally plunged into liquid nitrogen at -196°C and stored.

149 After one month of storage, four straws of each collection and respective equilibration  
150 time were thawed in a water-bath at 37°C for 30 seconds. Samples were diluted in BTS  
151 to a final concentration of  $50 \times 10^6$  spermatozoa/mL.

### 152 5.2.5. *Computer-assisted sperm analysis (CASA)*

153 After 10 min of thawing at 37°C, 5 µL of each sperm sample were placed onto a pre-  
154 warmed Makler chamber (Sefi-Medical Instruments; Haifa, Israel) and evaluated under a  
155 differential interference contrast (DIC; Nikon, Model Eclipse 80i; Tokyo; Japan) at 100×  
156 magnification. Five fields were examined using SCA (Microptics®- Barcelona/Spain) and  
157 the following parameters were recorded: percentages of total (TM) and progressive (PM)  
158 motility; percentage of rapid spermatozoa (RAPID); curvilinear velocity (VCL); straight-  
159 line velocity (VSL); average path velocity (VAP); percentages of linearity (LIN) and  
160 straightness (STR); amplitude of lateral head displacement (ALH); beat cross frequency  
161 (BCF); and percentages of hypermotility spermatozoa (HYPER) [28].

### 163 5.2.6. *Flow cytometry assays*

164 Six sperm parameters (integrities of plasma membrane and acrosome, membrane lipid  
165 disorder, membrane lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential, and  
166 intracellular levels of superoxides) were evaluated. Prior to analysis, sperm concentration  
167 was adjusted to a final concentration of  $5 \times 10^6$  spermatozoa/mL with BTS.

168 Flow cytometry analyses were performed using an Accuri C6 flow cytometer (Becton,  
169 Dickinson and Company, San Jose, CA). When required, the spectral overlap of each  
170 particular staining in flow cytometer analyses was compensated. Sperm cells were  
171 evaluated at an acquisition rate of approximately 600 to 1000 events/s, acquiring 10,000  
172 S59-positive events (Syto 59; Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon; USA) per assay.  
173 The cells were simultaneously excited by an argon laser at 488 nm and by a red laser at  
174 640 nm.

175 Integrities of plasma and acrosome membranes were assessed with Propidium Iodide  
176 (PI; Sigma-Aldrich Co., Saint Louis Missouri, EUA; 3.3 µg/mL; band pass filter: 610/20

177 nm) and *Pisum sativum* agglutinin conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC-PSA;  
178 Sigma-Aldrich Co., Saint Louis Missouri, EUA; 0.6 mg/ mL; band pass filter: 530/30 nm).  
179 Sperm samples were stained simultaneous with S59, PI and FITC-PSA [29], and  
180 incubated at 37°C for 10 min in the dark. After incubation, samples were diluted by the  
181 addition of 150 µL of TALP and then analyzed by flow cytometry [30, 27].

182 Membrane lipid disorder was assessed with Merocyanine 540 (M540; Molecular  
183 Probes Inc., Eugene, Oregon; EUA; 16.2 µM; BP: 585/40 nm). Briefly, samples were first  
184 stained with YO-PRO-1 (YP; Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon; EUA; 7,5 µM;  
185 band pass filter 530/15 nm) at 37°C for 10 min in the dark. Following this, S59 was added  
186 and samples were incubated at 37°C for min in the dark [29]. Finally, spermatozoa were  
187 incubated with M540 at 37°C for 70 sec [31]. After incubation and addition of 150 µL of  
188 TALP, percentages of M540<sup>+</sup>/YO-PRO-1<sup>-</sup> and geometric mean intensity of M540<sup>+</sup> in  
189 viable cells (YP<sup>-</sup>) were evaluated by flow cytometry.

190 Mitochondrial membrane potential was evaluated in viable spermatozoa (PI<sup>-</sup>) by  
191 5,5',6,6'-tetra-chloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodide (JC-1: 1  
192 µM; BP: 585/40 nm). After dilution in TALP, samples were stained with S59, PI and JC-  
193 1, and then incubated at 37°C for 10 min in the dark [29], when after incubation the  
194 samples were diluted by the addition of 150 µL of TALP [30].

195 To evaluate lipid peroxidation of spermatozoa membranes, samples were stained  
196 with C11-BODIPY581/591 (BPY; 6.67 µg/mL; BP: 530/30 nm) at 37°C for 20 min in the  
197 dark [32]. Following this, spermatozoa were stained with PI and S59 at 37°C for 10 min  
198 in the dark [29]. Sperm were diluted in TALP to 2.5x10<sup>6</sup> spermatozoa/mL and were  
199 analyzed by flow cytometry. Percentages of viable spermatozoa without lipid  
200 peroxidation in their plasma membrane (BPY<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>) were recorded together with the  
201 geometric mean of fluorescence intensity of BPY in BPY<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup> cells.

202 Dihydroethidium (DHE; 2  $\mu$ M; BP: 585/40 nm) was used to assess intracellular  
203 superoxide ( $O_2^{\bullet-}$ ) levels [33]. Briefly, spermatozoa were incubated with DHE at 37°C for  
204 10 min in the dark. After incubation, YP (50 nM; BP: 530/30 nm) was added and  
205 incubated for further 10 min in the dark. Finally, cells were stained with S59 at 37°C for  
206 10 min in the dark [29]. After incubation, samples were diluted with 150  $\mu$ L of TALP.  
207 Percentages of viable spermatozoa with low intracellular superoxide levels (DHE<sup>-</sup>/YP<sup>-</sup>)  
208 and the geometric mean of DHE-fluorescence in DHE<sup>-</sup>/YP<sup>-</sup> cells.

209

### 210 5.2.7. Statistical analysis

211 Data were analyzed with a statistical package (IBM SPSS for Windows; Ver. 25.0;  
212 Armonk, NY, USA). Data were first tested for normal distribution (Shapiro-Wilk test)  
213 and homogeneity of variances (Levene test). Following this, ejaculates were classified as  
214 GFE or PFE based on their post-thaw sperm membrane integrity and total motility after  
215 ET of 0 h. With this purpose, a two-step hierarchical cluster analysis using the log-  
216 likelihood distance and the Bayesian-Schwarz criterion was run. The effects of ET on  
217 post-thaw sperm quality and function parameters was tested through a linear mixed model.  
218 The intra-subjects factor was the equilibration time (i.e. 0 h, 2 h and 4 h), the fixed-effects  
219 factor (inter-subjects) was the ejaculate group (GFE or PFE), and the random-effects  
220 factor was the boar. A post-hoc Sidak test was used for pair-wise comparisons and the  
221 level of significance was set at  $P \leq 0.05$ . Data are shown as mean  $\pm$  SEM and the level of  
222 significance was set  $P \leq 0.05$ .

223

## 224 5.3. Results

225 Based on their post-thaw sperm membrane integrity and motility, the 20 ejaculates  
226 were classified as GFE and PFE. Post-thaw sperm membrane integrity after an ET of 0 h



227 in GFE ranged from 36.9% to 48.1%, and from 10.2% to 31.2% in PFE. Post-thaw total  
228 sperm motility ranged from 24.7% to 31.5% in GFE, and 5.7% from to 21.4% in PFE.

229

### 230 *5.3.1. Computer-assisted sperm analysis (CASA)*

231 Percentages of total motile spermatozoa (TM; Table 1) following different ET were  
232  $27.33\% \pm 1.24$  for ET0h;  $30.23\% \pm 2.76$  for ET2h; and  $24.17\% \pm 1.96$  for ET4h in GFE.  
233 For PFE, these figures were  $13.22\% \pm 0.28$ ;  $15.51\% \pm 0.45$ ; and  $14.5\% \pm 0.40$ ,  
234 respectively. As expected, there were significant ( $P<0.05$ ) differences between GFE and  
235 PFE in all equilibration times. The most relevant result, however, was that, in GFE,  
236 percentages of TM spermatozoa after an ET of 2 h were significantly higher than after an  
237 ET of 4 h (Figure 7 and 8).

238 Significant differences between ETs were also observed for progressive motility in  
239 GFE, as percentages of PM spermatozoa when samples were left at 5°C for 2 h ( $15.60\%$   
240  $\pm 1.86$ ) were significantly higher than after 0 h or 4 h (0 h:  $13.10 \pm 0.83$ ; 4 h:  $11 \pm 1.09$   
241 (Table 1).

242

### 243 *5.3.2. Flow cytometry*

#### 244 *5.3.2.1. Plasma and acrosome membrane integrity*

245 Table 1 shows the percentages of spermatozoa with intact plasma membrane and  
246 acrosome in GFE and PFE, after cryopreservation with the three different ETs (0 h, 2 h  
247 or 4 h). Significant differences between GFE and PFE were observed in all ETs. With  
248 regard to the effects of ETs on each group, percentages of spermatozoa with intact plasma  
249 membrane and acrosome were higher after an ET of 2 h ( $40.52\% \pm 4.15$ ) than after ET of  
250 0 h ( $38.14\% \pm 2.09$ ) and 4 h ( $38.03\% \pm 4.01$ ) in GFE. In the case of PFE, an ET of 2 h  
251 was also found to exhibit significantly ( $P<0.05$ ) higher percentages of spermatozoa with

252 intact plasma membrane and acrosome (2 h:  $24.48\% \pm 0.40$  vs. 0 h:  $17.47\% \pm 0.42$ ) (Figure  
253 9).

254

#### 255 ***5.3.2.2. Membrane lipid disorder***

256 As shown in Table 1, the evaluation of membrane lipid disorder showed that an ET  
257 of 2 h at 5°C was beneficial for sperm cryotolerance, as percentages of intact cells (M540<sup>-</sup>  
258 /YP<sup>-</sup>) were significantly ( $P < 0.05$ ) higher ET2 than in ET0 and ET4, both in GFE and PFE.  
259 (GFE 2 h:  $26.44 \pm 0.24$ ; 0 h:  $13.60 \pm 0.72$ ; 4h:  $18.18 \pm 3.44$ ; PFE 2h:  $15.40 \pm 0.29$ ; 13.08  
260  $\pm 0.33$ ;  $19.17 \pm 0.51$ ) (Figure 10).

261

#### 262 ***5.3.2.3. Mitochondrial potential membrane***

263 Mitochondrial membrane potential was considered as high or moderate, based on the  
264 fluorescence intensity emitted by JC1<sub>aggregates</sub> and JC1<sub>monomers</sub>. The relationship between  
265 the two groups of cryotolerance showed differences before the time of 2 hours of  
266 equilibration, both for high membrane potential (GFE with  $88.18\% \pm 1.50$ ; and PFE with  
267  $67.45\% \pm 0.72$ ), as for moderate ( $11.39\% \pm 1.50$  GFE; and  $32.08\% \pm 0.72$  for PFE)  
268 ( $P < 0.05$ ) (Table 1). Relations between the equilibration periods within the same group  
269 were not identified.

270

#### 271 ***5.3.2.4. Membrane lipid peroxidation and intracellular superoxide levels***

272 The effects of different equilibration times on lipid peroxidation of sperm membrane  
273 and intracellular levels of superoxides were also evaluated in both GFE and PFE. In PFE,  
274 percentages of spermatozoa with high membrane lipid peroxidation and high levels of  
275 superoxides were significantly ( $P < 0.05$ ) higher in ET0 and ET4 than in ET2 were  
276 evaluated before the levels of superoxide anion and plasma membrane lipoperoxidation.

277 In both conditions, lower values were observed in the group of bad freezers under ET2h,  
278 when compared to GFE ( $P \leq 0.05$ ) (Table 1). Still under the same group, ET2h and ET4h  
279 presented small significance among themselves, under the conditions of peroxidation  
280 (Figure 11).

281

## 282 **5.4.Discussion**

283

284 Artificial insemination (AI) is the most used technology for pig breeding in Western  
285 countries [34, 35]. Although liquid-stored semen is utilized in 95-99% of cases, there are  
286 some specific situations that may advise the use of frozen-thawed sperm [9]. These cases  
287 include specific scenarios, such as preservation of genetic material of boars of high value,  
288 prevention of health outbreaks, and transport throughout long distances [10]. However, a  
289 main disadvantage of the use of frozen-thawed boar sperm for AI is the reduced post-  
290 thaw survival and motility, which results from the negative impact of cryopreservation  
291 procedures and has a detrimental effect upon reproductive performance [37]. Apart from  
292 sperm cryodamage and reduced fertilizing ability, another inconvenient of boar sperm  
293 cryopreservation is the individual variability between and within ejaculates [10]. In effect,  
294 while separate ejaculates exhibit a fresh sperm quality above the standard thresholds, their  
295 resilience to withstand freezing and thawing may greatly differ each other and post-thaw  
296 sperm quality may be much reduced.

297 Previous research in boar sperm cryopreservation has mainly focused on improving  
298 protocols, finding suitable packages, and adding antioxidants and seminal plasma to  
299 improve the post-thaw sperm quality and fertilizing ability [37]. Other research efforts  
300 have been aimed at looking for freezability protein markers in fresh semen, as this can  
301 help identify good and poor freezability ejaculates (GFE and PFE) before  
302 cryopreservation takes place [38, 39]. A low number of studies have paid attention on the

303 effects of the holding time (i.e. the time during which liquid-stored semen is kept at 17°C  
304 prior to freezing; 14, 11, 40,12, 41], and there are very few that have focused on how the  
305 ET, i.e. the time during which sperm are held at 5°C after the cooling step, affects the  
306 cryopreservation success [42]. For this reason, this work sought to evaluate the impact of  
307 three different ETs at 5°C (0 h, 2 h and 4 h) and compared these effects between GFE and  
308 PFE.

309 As we expected, we could classify the ejaculates as of good or poor freezability based  
310 on their post-thaw sperm motility and viability. In addition, we found that sperm quality  
311 and functional parameters were better when the ET was of 2 h in both GFE and PFE.  
312 However, the extent of that effect differed between GFE and PFE and depended on the  
313 sperm parameter. Thus, in the case of sperm motility, the ET of 2 h had a more apparent  
314 impact on GFE than on PFE. In addition, whereas ET2 was better than ET0 and ET4 for  
315 plasma membrane and acrosome integrity, and percentages of spermatozoa with low lipid  
316 peroxidation and low superoxide levels in PFE, no significant differences between ETs  
317 were observed in GFE. As far as membrane lipid disorder is concerned, it was low after  
318 an ET of 2 h in both GFE and PFE. In contrast to the aforementioned, no differences  
319 between ETs were observed for mitochondrial membrane potential, and ET4 either had  
320 no effect or was detrimental for sperm function and survival both in GFE and PFE. All  
321 these results indicate that ET2 is better for the success of boar sperm cryopreservation,  
322 especially in the case of PFE.

323 Although no similar studies comparing the effects of different ETs on GFE and PFE  
324 have previously been conducted, there are others that, in other conditions found that ET2  
325 better than longer equilibration times. In effect, Schäfer et al. [42] evaluated the effects  
326 of two holding time at 17°C (2 h and 24 h) and those of the equilibration time at 5°C in a  
327 medium without glycerol (2 h, 4 h, 24 h, 48 h). While these authors found that an

328 equilibration time of 2 h was better than that of 24 h, they also found that equilibration  
329 times of 2 h and 4 h had a positive effect, and prolonged equilibration times (24 h and 48  
330 h) were detrimental, especially in sperm motility parameters [42]. Another study  
331 conducted in pigs was also found that the optimal equilibration time was 2-3 h. However,  
332 in that case, the experimental design differed from that of our study, since these authors  
333 performed equilibration in presence of glycerol [43]. Related to this, an earlier study  
334 demonstrated that an exposure of sperm to an equilibration time in the presence of  
335 glycerol for 5-75 min had no detrimental impact if performed at 5°C [44]. Further  
336 experiments are required to determine whether our results would be similar if sperm were  
337 held at 5°C after the addition of glycerol.

338 While, as aforementioned, the effects of the different equilibration times for boar  
339 sperm cryopreservation have not been much studied, more research in other livestock  
340 animals has been conducted, especially in bulls and to a lesser extent in buffalos and rams.  
341 In the case of bull sperm, the effects of the equilibration time are less clear, and this  
342 because differences between methods and the sperm parameters evaluated. In effect, on  
343 the one hand Wiggin and Almquist [45] compared five equilibration times (1 h, 2 h, 4 h,  
344 8 h and 16 h) and concluded that 2 h was the best for post-thaw sperm motility. However,  
345 another study found after evaluating the post-thaw sperm quality (sperm motility, plasma  
346 membrane integrity and DNA fragmentation) and fertilizing ability (through a  
347 heterologous hemizona assay with in vitro matured pig oocytes) that ETs as long as 48 h  
348 and 72 h were better than shorter ETs (6 h) and longer ETs (96 h) [46]. Moreover, and in  
349 contrast to our results which showed that an ET of 4 h was detrimental, Murphy et al. [47]  
350 found that no further damage on bull sperm was made when sperm were exposed to an  
351 ET of 72 h. Agreeing with our data, Fleisch et al. [48] found that the ET does not affect  
352 the mitochondrial membrane potential; nevertheless, these authors also observed that

353 prolonging the ET from 4 h to 96 h increased the post-thaw sperm motility and viability  
354 but had no effect on field fertility [48]. Working with epididymal sperm from Nelore  
355 bulls, Almeida et al. [49] found that an equilibration time of 2 h and 4 h at 5°C was better  
356 than that of 0 h when glycerol was added at a final concentration of 5%. Also in bulls,  
357 Leite et al. [50] compared three different equilibration times (0 h, 2 h and 4 h) and found  
358 that the one that yielded the best results was 4 h for sperm motility and acrosome and  
359 plasma membrane. Therefore, while in bull sperm the ET at 5°C before sperm  
360 cryopreservation is related to better sperm resilience to withstand freeze-thawing, there  
361 are much differences between studies.

362 In another study in buffalo sperm, an ET of 4 h was better than that of 2 h or 6 h, for  
363 sperm motility, plasma membrane and acrosome integrity, and mitochondrial membrane  
364 potential after thawing [51]. In ram sperm, Purdy [52] compared the effects of different  
365 holding times (0 h, 24 h and 48 h) and found no significant differences in the sperm  
366 motility, plasma membrane integrity and fertilizing ability, which means that neither  
367 beneficial nor detrimental effect of prolonged ETs was observed. Also in rams, another  
368 study found that plasma membrane integrity was higher following an equilibration time  
369 of 12 h [53].

370 The potential beneficial effects of a prolonged equilibration time are unknown, but  
371 there are likely to be related to the sperm plasma membrane. In fact, our data showed that  
372 one of the most noticeable effects were on those parameters that are related to membrane  
373 integrity, such as the integrity of acrosome and plasma membrane and the membrane lipid  
374 disorder. In contrast, there was no effect on the mitochondrial membrane potential.  
375 Although there are no previous studies having tackled this matter, current evidence  
376 indicates that the beneficial impact from a prolonged holding time at 17°C largely depends  
377 on the stabilizing effects on the plasma membrane [11]. In addition, since GFE and PFE

378 are known to differ, amongst other parameters, in the integrity of the plasma membrane  
379 and acrosome and our results show that the effects of the prolonged equilibration time  
380 differ between GFE and PFE, this supports that the ET plays a stabilizing role with regard  
381 to sperm membranes. In this context, it is worth remembering that cooling and freeze-  
382 thawing induce phospholipid scrambling in the sperm plasma membrane, although these  
383 changes differ between capacitation and the capacitation-like changes occurring during  
384 freeze-thawing [54].

385

### 386 **5.5.Conclusion**

387 In conclusion, this study has shown, for the first time, that the effects of ET at 5°C  
388 highly rely upon the intrinsic ejaculate freezability and the sperm parameter evaluated, so  
389 that while post-thaw sperm motility of GFE is better maintained following an ET2,  
390 plasma membrane and acrosome integrities are higher when sperm from PFE are exposed  
391 to ET2. We also observed that a prolonged ET of 4 h was detrimental for both GFE and  
392 PFE, and that an ET of 2h showed no detrimental effects on any sperm parameter.  
393 Therefore, we recommend an ET of 2 h to be included at the end of the cooling step during  
394 boar sperm cryopreservation. However, further research is required to evaluate which the  
395 impact of exposing sperm to glycerol during that ET of 2 h is.

396

### 397 **Conflict of interest**

398 The authors have no conflicts of interest to declare.

399

### 400 **Acknowledgments**

401 This research was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de  
402 São Paulo (FAPESP), gants 2017/10821-2 e 2019/01124-1.

403

404 **5.6.References**

- 405 [1] Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC. Storage of boar semen. *Animal*  
406 *Reproduction Science* 2000; 62:143-172.
- 407 [2] Knox RV. The Fertility of Frozen Boar Sperm When used for Artificial  
408 Insemination. *Reproduction in Domestic Animals* 2015; 50:90-97.
- 409 [3] Flores E, Ramió-Lluch L, Bucci D, Fernández-Novell JM, Peña A, Rodríguez-Gil  
410 JE. Freezing-thawing induces alterations in histone H1-DNA binding and the breaking  
411 of protein-DNA disulfide bonds in boar sperm. *Theriogenology* 2011; 76:1450–1464.
- 412 [4] Kumaresan A, Siqueira AP, Hossain MS, Bergqvist, AS. Cryopreservation-induced  
413 alterations in protein tyrosine phosphorylation of spermatozoa from different portions of  
414 the boar ejaculate. *Cryobiology* 2011; 63:137–144.
- 415 [5] Vadnais ML, Althouse GC. Characterization of capacitation, cryoinjury, and the role  
416 of seminal plasma in porcine sperm. *Theriogenology* 2011; 76:1508–1516.
- 417 [6] Yeste M, Flores E, Estrada E; Bonet S, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. Reduced  
418 glutathione and procaine hydrochloride protect the nucleoprotein structure of boar  
419 spermatozoa during freeze-thawing by stabilizing disulfide bonds. *Reproduction,*  
420 *Fertility and Development* 2013; 25:1036-1050.
- 421 [7] Yeste M, Estrada E, Casas I, Bonet S, Rodríguez-Gil JE. Good and bad freezability  
422 boar ejaculates differ in the integrity of nucleoprotein structure after freeze-thawing but  
423 not in ROS levels. *Theriogenology* 2013; 6:929-939.
- 424 [8] Rodríguez-Martínez H, Wallgren M. Advances in boar semen cryopreservation.  
425 *Veterinary Medicine International* 2010; 2011.
- 426 [9] Yeste M. Recent Advances in Boar Sperm Cryopreservation: State of the Art and  
427 Current Perspectives. *Reproduction Domestic Animals* 2015; 50:71-79.



- 428 [10] Yeste, M. Sperm cryopreservation update: cryodamage, markers and factors  
429 affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology* 2016; 85:47-64.
- 430 [11] Casas I, Althouse GC. The protective effect of a 17°C holding time on boar sperm  
431 plasma membrane fluidity after exposure to 5°C. *Cryobiology* 2013; 66:69-75.
- 432 [12] Yeste M, Estrada E, Rivera Del Álamo MM, Bonet S, Rigau T, Rodríguez Gil JE.  
433 The increase in phosphorylation levels of serine residues of protein HSP70 during  
434 holding time at 17°C is concomitant with a higher cryotolerance of boar spermatozoa.  
435 *PLOS ONE* 2014; 9:1-20.
- 436 [13] Martínez-Alborcia MJ, Morrell JM, Parrilla I, Barranco I, Vázquez JM, Martínez  
437 EA, Roca J. Improvement of boar sperm cryosurvival by using single-layer colloid  
438 centrifugation prior freezing. *Theriogenology* 2012; 78:1117–1125.
- 439 [14] Eriksson BM, Vázquez JM, Martínez EA, Roca J, Lucas X, Rodríguez-Martínez H.  
440 Effects of holding time during cooling and of type of package on plasma membrane  
441 integrity, motility and in vitro oocyte penetration ability of frozen thawed boar  
442 spermatozoa. *Theriogenology* 2001; 55:1593–1605.
- 443 [15] Ekwall H, Hernández M, Saravia F, Rodríguez-Martínez H. Cryo-scanning electron  
444 microscopy (Cryo-SEM) of boar semen frozen in medium-straws and MiniFlatPacks.  
445 *Theriogenology* 2007; 67:1463– 1472.
- 446 [16] Didion BA, Braun GD, Duggan MV. Field fertility of frozen boar semen: a  
447 retrospective report comprising over 2600 AI services spanning a four years period.  
448 *Animal Reproduction Science* 2013; 137:189–196.
- 449 [17] Casas I, Sancho S, Briz M, Pinart E, Bussalleu E, Yeste M. Freezability prediction  
450 of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins.  
451 *Theriogenology* 2009; 72:930–48.

- 452 [18] Flores E, Fernandez-Novell JM, Peña A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE.  
453 Cryopreservation- induced alterations in boar spermatozoa mitochondrial function are  
454 related to changes in the expression and location of midpiece mitofusin-2 and actin  
455 network. *Theriogenology* 2010; 74:354– 363.
- 456 [19] Juarez JD, Parrilla I, Vazquez JM, Martínez EA, Roca J. Boar semen can tolerate  
457 rapid cooling rates prior to freezing. *Reproduction, Fertility and Development* 2011;  
458 23:681–690.
- 459 [20] Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*  
460 2000; 62:77-111.
- 461 [21] Fuller BJ. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen  
462 state. *Cryo Letters* 2004; 25:375–388.
- 463 [22] Macias Garcia B, Ortega Ferrulosa C, Aparicio IM, Miro-Moran A, Morillo  
464 Rodríguez A, Gallardo Bolanos JM, Gonzales Fernandez L, Balao da Silva CM,  
465 Rodríguez-Martínez H, Tapia JA, Peña FJ. Toxicity of glycerol for the stallion  
466 spermatozoa: effects on membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and  
467 mitochondrial membrane potential. *Theriogenology* 2012; 77:1280–1289.
- 468 [23] Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF. Mode of action of cryoprotectants for sperm  
469 preservation. *Animal. Reproduction Science* 2016:169:2–5.
- 470 [24] Waterhouse, K. E.; Hofmo, P. O.; Tverdal, A.; Miller, R. R. Within and between  
471 breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of  
472 boar sperm. *Reproduction* 2006, 131:887–94.
- 473 [25] Pursel VG, Johnson LA. Freezing of boar spermatozoa: fertiliz- ing capacity with  
474 concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal of Animal Science*  
475 1975;40:99–102.

- 476 [26] Torres MA, Díaz R, Boguen R, Martins SMMK, Ravagnani GM, Leal DF, Oliveria  
477 ML, Muro BBD, Parra BM, Meirelles FV, Papa FO, Dell'aqua JA, Alvarenga MA,  
478 Moretti AS, Sepúlveda N, Andrade AFC. Novel flow cytometry analyses of boar sperm  
479 viability: Can the addition of whole sperm-rich fraction seminal plasma to frozen-  
480 thawed boar sperm affect it? PLOS ONE 2016; 11:1-20.
- 481 [27] Torres MA, Ravagnani GM, Leal DF, Martins SMMK, Muro BBD, Meirelles FV,  
482 Papa FO, Dell'aqua JA, Alvarenga MA, Moretti AS, Andrade AFC. Seminal plasma  
483 arising from the whole boar sperm-rich fraction increase the stability of sperm  
484 membrane after thawing. Journal of Animal Science 2016; 94:1906-1912.
- 485 [28] Pavaneli APP, Passarelli MS, Freitas FV, Ravagnani GM, Torres MA, Martins  
486 SMMK, Yeste M, Andrade AFC. Removal of seminal plasma prior to liquid storage of  
487 boar spermatozoa: A practice that can improve their fertilizing ability. Theriogenology  
488 2019; 125:79-86.
- 489 [29] Díaz R, Torres MA, Paz E, Quinñones J, Bravo S, Farías JG, Sepúlveda N. Dietary  
490 inclusion of fish oil changes the semen liquid composition but does not improve the  
491 post-thaw semen quality of ram spermatozoa. Animal Reproduction Science 2017;  
492 183:132-142.
- 493 [30] Andrade AFC, Zaffalon FG, Celeghini ECC, Nascimento J, Bressan FF, Martins  
494 SMMK, Arruda RP. Post thaw addition of seminal plasma reduce tyrosine  
495 phosphorylation on the surface of cryopreserved equine Sperm, but does not reduce  
496 lipiperoxidaion. Theriogenology 2012; 77:1866-1872.
- 497 [31] Flesch FM, Colenbrander B, Van-Golde LM, Gadella BM. Capacitation induces  
498 tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane, Biochem.  
499 Biophys. Res. Commun 1999; 262:787-792.

- 500 [32] Neild DM, Brouwers JF, Colenbrander B, Agüero A, Gadella BM. Lipid peroxide  
501 formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion  
502 spermatozoa, *Molecular Reproductive and Development* 2005; 72:230–238.
- 503 [33] Rice JB, Stoll LL, Li WG, Denning GM, Weydert J, Charipare E, Richenbacher  
504 WE.; Miller FJ, Weintraub N. Low level endotoxin induces potent inflammatory  
505 activation of human blood vessels: Inhibition by statins, *Arterioscler. Throm. Vasc.*  
506 *Biol.* 2003; 23:1576-1582.
- 507 [34] Knox RV. Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology* 2016; 85:83-93.
- 508 [35] Roca J, Parrilla I, Bolarin A, Martínez EA, Rodríguez-Martínez H. Will AI in pigs  
509 become more efficient? *Theriogenology* 2016; 86:187-193.
- 510 [36] Yeste M., Rodríguez-Gil JE, Bonet S. Artificial insemination with frozen-thawed  
511 boar sperm. *Molecular Reproduction and Development* 2017; 84:802-813.
- 512 [37] Recuero S, Fernández-Fuertes B, Bonet S, Barranco I, Yeste M. Potential of  
513 seminal plasma to improve the fertility of frozen-thawed boar spermatozoa.  
514 *Theriogenology* 2019; 137:36-42.
- 515 [38] Yeste M, Morató R, Rodríguez-Gil JE, Bonet S, Prieto-Martínez N. Aquaporins in  
516 the male reproductive tract and sperm: functional implications and cryobiology.  
517 *Reproduction in Domestic Animals* 2017; 52 Suppl 4:12-27.
- 518 [39] Llavanera M, Delgado-Bermúdez A, Fernández-Fuertes B, Recuero S, Mateo Y,  
519 Bonet S, Barranco I, Yeste M. GSTM3, but not IZUMO1, is a cryotolerance marker of  
520 boar sperm. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 2019; 10:61.
- 521 [40] Tomás C, Gómez-Fernández J, Gómez-Izquierdo E, de Mercado E. Effect of the  
522 holding time at 15°C prior to cryopreservation, the thawing rate and the post-thaw  
523 incubation temperature on the boar sperm quality after cryopreservation. *Animal*  
524 *Reproduction Science* 2014; 144:115-121.

- 525 [41] Torres MA, Monteiro MS, Passarelli MS, Papa FO, Dell'Aqua JA Jr, Alvarenga  
526 MA, Martins SMMK, Andrade AFC. The ideal holding time for boar semen is 24 h at  
527 17°C prior to short-cryopreservation protocols. *Cryobiology* 2019; 86:58-64.
- 528 [42] Schäfer J, Waberski D, Jung M, Schulze M. Impact of holding and equilibration  
529 time on post-thaw quality of shipped boar semen. *Animal Reproduction Science* 2017;  
530 187:109-115.
- 531 [43] Yi YJ, Cheon YM, Park CS. Effect of N-acetyl-D-glucosamine, and glycerol  
532 concentration and equilibration time on acrosome morphology and motility of frozen-  
533 thawed boar sperm. *Animal Reproduction Science* 2002; 69:91-97.
- 534 [44] Almlid T, Johnson LA. Effects of glycerol concentration, equilibration time and  
535 temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in  
536 straws. *Journal of Animal Science* 1988; 66:2899-2905.
- 537 [45] Wiggin HB, Almquist JO. Combinations of glycerol percent, glycerol equilibration  
538 time, and thawing rate upon freezability of bull spermatozoa in plastic straws. *Journal of*  
539 *Dairy Science* 1975; 58:416-419.
- 540 [46] Gürler H, Podhajsky E, Özen D, Leiding C, Bollwein H, Meinecke-Tillmann S.  
541 Suitability of the hemi-zona assay for the evaluation of the effect of the length of the  
542 equilibration period before cryopreservation. *Theriogenology* 2018; 106:157-163.
- 543 [47] Murphy EM, Eivers B, O'Meara CM, Lonergan P, Fair S. Effect of increasing  
544 equilibration time of diluted bull semen up to 72 h prior to freezing on sperm quality  
545 parameters and calving rate following artificial insemination. *Theriogenology* 2018;  
546 108: 217-222.
- 547 [48] Fleisch A, Malama E, Witschi U, Leiding C, Siuda M, Janett F, Bollwein H.  
548 Effects of an extension of the equilibration period up to 96 hours on the characteristics  
549 of cryopreserved bull semen. *Theriogenology* 2017; 89:255-262.

- 550 [49] Almeida FC, Silva SV, Souza HM, Gomes WA, Lima Filho JA, Wicke AA, Batista  
551 AM, Guerra MM. Effects of glycerol, equilibration time and antioxidants on post-thaw  
552 functional integrity of bovine spermatozoa directly obtained from epididymis.  
553 *Andrologia* 2017; 49.
- 554 [50] Leite TG, do Vale Filho VR, de Arruda RP, de Andrade AF, Emerick LL, Zaffalon  
555 FG, Martins JA, de Andrade VJ. Effects of extender and equilibration time on post-thaw  
556 motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA  
557 and flow cytometry. *Animal Reproduction Science* 2010; 120:31-38.
- 558 [51] Shah SA, Andrabi SM, Qureshi IZ. Effect of equilibration times, freezing, and  
559 thawing rates on post-thaw quality of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa.  
560 *Andrology* 2016; 4:972-976.
- 561 [52] Purdy PH. The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48 h at 5°C prior to  
562 cryopreservation. *Animal Reproduction Science* 2006; 93:114-123.
- 563 [53] Câmara DR, Silva SV, Almeida FC, Nunes JF, Guerra MM. Effects of antioxidants  
564 and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. *Theriogenology*  
565 2011; 76:342-350.
- 566 [54] Guthrie HD, Welch GR. Impact of storage prior to cryopreservation on plasma  
567 membrane function and fertility of boar sperm. *Theriogenology* 2005; 63: 396-410.  
568

# CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou, pela primeira vez, que os efeitos dos tempos de equilíbrio, estão associados ao grau de congelabilidade do ejaculado suíno e do parâmetro espermático avaliado, de modo que, a motilidade espermática pós-descongelação de ejaculados considerado como bons congeladores (GFE), mostrou-se melhor quando mantidos há um tempo de equilíbrio de 2 horas. Já as integridades de membrana plasmática e acrossomal mostraram-se maiores quando os espermatozoides dos ejaculados classificados como maus congeladores (PFE), também são expostos a 2 horas de tempo de equilíbrio.

Observou-se ainda que um período de 4 horas foi prejudicial para ambos os grupos de ejaculados, e que um tempo de equilíbrio de 2 horas não mostrou efeitos prejudiciais nos parâmetros avaliados. Portanto, recomendamos que períodos relativos a 2 horas de tempo de equilíbrio sejam incluídos aos protocolos de criopreservação de espermatozoides suínos, afim de se obter melhores resultados pós-descongelação do mesmo. Contudo, novas pesquisas são necessárias, para que se avalie qual o impacto da exposição dos espermatozoides ao glicerol durante tempos de equilíbrio de 2 horas, objetivando-se comparações, e compreender, qual o papel molecular desta etapa para a célula espermática.



# REFERÊNCIAS

---

## REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 5 ed. United States of America: Ed. Routledge, 2010.
- ALMEIDA, F. C.; SILVA, S. V.; SOUZA, H. M.; GOMES, W. A.; LIMA FILHO, J. A. C.; WICKE A. A.; BATISTA, A. M.; GUERRA, M. M. P. Effects of glycerol, equilibration time and antioxidants on post-thaw functional integrity of bovine spermatozoa directly obtained from epididymis. **Andrologia**, v. 49, p. 1-9, 2017.
- AMANN, R. P. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v. 7, p. 45-173, 1987.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, Cap. 80, p. 717-718, 1992.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Practice**, v. 7, n. 3, p. 145 173, 1987.
- BAILEY, J. L.; LESSARD, C.; JACQUES, J.; BRÈQUE, C.; DOBRINSKI, I.; ZENG, W.; GALANTINO-HOMER, H. L. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. **Theriogenology**, v. 70, n. 8, p. 1251–1259, 2008.
- BAISHA, S. K.; BISWAS, R. K.; KADIRVEL, G.; DEKA, B. C.; KUMAR, S.; SINHA, S.; DUTTA, D. J.; SAIKIA, G. K. Effect of conventional and controlled freezing method on the post thaw characteristics of boar spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 149, n. 3-4, p. 231–237, 2014.
- BELALA, R.; BRIAND-AMIRAT, L.; VINCIGUERRA, L.; TAINTURIER, D.; KAIDI, R.; THORIN, C.; MICHAUD, S.; ANTON, M.; BENCHARIF, D. Effect of equilibration time on the motility and functional integrity of canine spermatozoa frozen in three different extenders. **Research Veterinary Science**, v. 106, p. 66-73, 2016.
- BOLLWEIN, H.; FUCHS, I.; KOESS, C. Interrelationship between plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation in cryopreserved bovine spermatozoa. **Reproduction Domestic Animals**, v. 43, p. 189–195, 2008.
- BRISKO, S. P.; VAN-WAGNER, G. S.; GRAHAN, J. K.; SQUIRES, L. E. Motility, morphology and triple stain analysis of fresh, cooled and frozen-thawed stallion spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 56, p. 111-120, 2000.
- CASAS, I.; ALTHOUSE, G. C. The protective effect of a 17°C holding time on boar sperm plasma membrane fluidity after exposure to 5°C. **Cryobiology**, v. 66, n. 1, p. 69–75, 2013.
- CASAS, I.; SANCHO, S.; BRIZ, M.; PINART, E.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; BONET, S. Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins. **Theriogenology**, v. 72, p. 930–48, 2009.
- CASAS, I.; SANCHO, S.; BRIZ, M.; PINART, E.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; BONET, S. Fertility after postcervical artificial insemination with cryopreserved Sperm from boar

ejaculates of good and poor freezability. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 69-76, 2010.

CELEGHINI, E. C. C. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. 2005. 186f. (**Tese Doutorado em Medicina Veterinária e Reprodução Animal**) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

CHEN, X.; ZHU, H.; HU, C.; HAO, H.; ZHANG, J.; LI, K.; WANG, D. Identification of differentially expressed proteins in fresh and frozen- thawed boar spermatozoa by iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS. **Reproduction**, v. 147, p. 321–330, 2014.

CRAGLE, R.G.; MYERS, R.M.; WAUGH, R.K. et al. The effects of various levels of sodium citrate, glycerol, and equilibration time on survival of bovine spermatozoa after storage at –79°C. **Journal of Dairy Science**, v. 38, n. 5, p. 508-514, 1955.

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, n. 2, p. 171–183, 1990.

DU BOIS, S.; LEN, J. A.; PARLEVLIET, J. M.; EILTS, B. E. Effects of Cooling Time on Membrane Integrity and Motility of Frozen-Thawed Canine Spermatozoa using Two Different Commercial Egg Yolk-based Extenders at Two Different Cooldown Equilibration Times. **Reproduction Domestic Animals**, v. 47, p. 278-280, 2012.

DUTTA, S.; GHOSH, B. B.; BONDYOPADHYAY, S.K.; CHOUDHURY, R. R.; BASU, S.; GUPTA, R. D. Effect of different extenders, glycerol levels and equilibration times on deep-freezing of buck semen. **Indian Journal of Animal Health**, v. 35, n. 1, p. 35-38; 1996.

ESTRADA, E.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; ROCHA, L. G.; BALASCH, S.; BONET, S.; YESTE, M. Supplementing cryopreservation media with reduced glutathione increases fertility and prolificacy of sows inseminated with frozen-thawed boar semen. **Andrology**, v. 2, p. 88–99, 2014.

ESTRADA, E.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; RIVERA DEL ÁLAMO, M. M.; PEÑA, A.; YESTE, M. Effects of reduced glutathione on acrosin activity in frozen- thawed boar spermatozoa. **Reproduction Fertility and Development**, v. 29, p. 283-293, 2015.

FERNÁNDEZ-GAGO, R.; DOMÍNGUEZ, J. C.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Seminal plasma applied posthawing affects boar sperm physiology: A flow cytometry study. **Theriogenology**, v. 80, n. 4, p. 400–410, 2013.

FLORES, E.; RAMIÓ-LLUCH, L.; BUCCI, D.; FERNÁNDEZ-NOVELL, J. M.; PEÑA, A.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. Freezing-thawing induces alterations in histone H1-DNA binding and the breaking of protein-DNA disulfide bonds in boar sperm. **Theriogenology**, v. 76, p. 1450–1464, 2011.

FULLER, B. J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. **Cryo Letters**, v. 25, p. 375–388, 2004.

- GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J.; GÓMEZ-IZQUIERDO, E.; TOMÁS, C.; GONZÁLES-BULNES, A.; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, R.; DE MERCADO, E. Inclusion of seminal plasma in sperm cryopreservation of Iberian pig. **Animal Reproduction Science**, v. 130, n. 1-2, p. 82–90, 2012.
- GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2 ed. São Paulo: Editora Roca, 2008. p. 133.
- GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America Equine Practitioners**, v. 12, n. 1, p. 131-147, 1996.
- GURLER, H.; PODHAJSKY, E.; OZEN, D.; LEIDING, C.; BOLLWEIN, H.; MEINECKE-TILLMANN, S. Suitability of the hemi-zona assay for the evaluation of the effect of the length of the equilibration period before cryopreservation. **Theriogenology**, v. 106, p. 157-163, 2018.
- HERNÁNDEZ, M.; ROCA, J.; GIL, M. A.; VÁZQUEZ, J. M.; MARTÍNEZ, E. A. Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability. **Theriogenology**, v. 67, n. 9, p. 1436–1445, 2007.
- HOLT, W. V.; MEDRANO, A.; THURSTON, L. M.; WATSON, P. F. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: Insights from the cryomicroscope. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 370–382, 2005.
- IVANOW, E. I. De la fécondation artificielle chez les mammifères. **Arch Sci Biol**, v. 12, p. 377–511, 1907.
- JIMENEZ, C. F. Effects of Equex STM and equilibration time on the pre-freeze and post-thaw motility of equine epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, v. 28, p. 773-782, 1987.
- JOHNSON, L. A. Current developments in swine semen: preservation, artificial insemination and sperm sexing. In: **International Proceedings Veterinary Swine Congress**. v. 1, p. 225-229, 1998.
- JOHNSON, L. A.; WEITZE, K. F.; FISER, P.; MAXWELL, W. M. C. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1-3, p. 143–172, 2000.
- 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 (Suppl 2), p. 90–97, 2015.
- LEITE, T. G.; VALE-FILHO, V. R.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; EMERICK, L. L.; ZAFFALON, F. G.; MARTINS, J. A. M.; ANDRADE, V. J. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, v. 20, p. 31-38, 2010.
- LIU, Y.; TORRES, L.; TIERSCH, T. R. Cryopreservation of sperm bundles (spermatozeugmata) from endangered livebearing goodeids. **Cryobiology**, v. 82, p. 49-56, 2018.
- LÓPEZ-UREÑA, E.; ALVAREZ, M.; GOMES-ALVEZ, S.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, C.; BORRAGAN, S.; ANEL-LÓPEZ, L.; DE PAZ, P.; ANEL, L. Tolerance of brown bear

spermatozoa to conditions of pre-freezing cooling rate and equilibration time.

**Theriogenology**, v. 81, p. 1229-1238, 2014.

MACIAS GARCIA, B.; ORTEGA FERRULOSA, C.; APARICIO, I. M.; MIRO-MORAN, A.; MORILLO RODRÍGUEZ, A.; GALLARDO BOLANOS, J. M.; GONZALES FERNANDEZ, L.; BALAO DA SILVA, C. M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; TAPIA, J. A.; PEÑA F. J. Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa: effects on membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential.

**Theriogenology**, v. 77, p. 1280–1289, 2012.

MARTIN, I.C.A. The influence of diluents and processing time after ejaculation on the revival of deep-frozen bull spermatozoa. **Journal of Agricultural Science**, v. 61, p. 55- 63, 1963.

MARTÍNEZ, E. A.; VÁZQUEZ, J. M.; ROCA, J.; LUCAS, X.; GIL, M. A.; PARRILLA, I.; VÁZQUEZ, J. L. DAN, B. N. Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non sedated sows. **Reproduction**, v. 123, p. 163-170, 2002.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 1984; 247: 125-142. **American Journal Physiology Cell Physiology**, v. 247, p. 125–142, 1984.

MEYERS, S. A.; TABLIN, F.; COWE, J. H. Does cellular injury resulting from cryopreservation share traits with sperm capacitation? **In: Proceedings of a Work Shop on Transporting Gametes and Embryos**, v. 12, p.70-73, 2003.

MILLER, W.J.; VANDEMARK, W.L. The influence of glycerol level, various temperature aspects, and certain other factors on the survival of bull spermatozoa at subzero temperatures. **Journal of Dairy Science**, v. 37, n. 1, p. 45-51, 1954.

MORAN, D. M. Effects of cooling rate and storage temperature on motion characteristics of stallion spermatozoa. Fort Collins: Colorado State University, 1992.

MURPHY, E. M.; EIVERS, B.; O'MEARA, C. M.; LONERGAN, P.; FAIR, S. Effect of increasing equilibration time of diluted bull semen up to 72 h prior to freezing on sperm quality parameters and calving rate following artificial insemination. **Theriogenology**, v. 108, p. 217-222, 2018.

NEILD, D. M.; GADELLA, B. M.; COLENBRANDER, B. Lipid peroxidation in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 58, n. 2-4, p. 295- 298, 2002.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principios de Bioquímica de Lehninger**. 6 ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2014.

O'CONNELL, M.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondria function. **Human Reproduction**, v. 17, p. 704-709, 2002.

PARKS, J. E.; LYNCH, D. V. Lipid composition and thermotropic phase behaviour of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v. 29, p. 255–266, 1992.

- PENÃ, F. J.; SARAVIA, F.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Detection of early changes in sperm membrane integrity pre-freezing can estimate post-thaw quality of boar spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 97, n. 1-2, p. 74–83, 2007.
- POLGE, C.; ROWSON, L.E.A. Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing to  $-79^{\circ}\text{C}$ . *Nature*, v. 169, n. 4302, p. 626, 1952.
- PRADIEE, J.; ESTESO, M. C.; CASTAÑO, C.; TOLEDANO-DÍAZ, A.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, J.; SANTIAGO-MORENO, J. Cryopreservation of epididymal sperm from ibexes (*Capra pyrenaica*) using short equilibration time with glycerol. **Theriogenology**, v. 82, p. 525-528, 2014.
- PINART, E.; YESTE, M.; BONET, S. Acrosin is a good predictor of boar sperm freezability. **Theriogenology**, v. 83, p. 1525–1533, 2015.
- PUGLIESI, G.; FURST, R.; CARVALHO, G. R. Efeito de diferentes tempos de equilíbrio na criopreservação de sêmen de garanhões. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 19, n. 3, p. 172-177, 2012.
- PURSEL, V. G.; JOHNSON, L. A. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. **Journal of Animal Science**, v. 40, p. 99-102, 1975.
- RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; ESTRADA, E. Artificial insemination in boar reproduction. In **Boar Reproduction**. Berlin: Springer, p. 589–608, 2013.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1-3, p. 77-111, 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 MiniFlatPacks. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 662–675, 2009.
- SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Freezing of boar semen can be simplified by handling a specific portion of the ejaculate with a shorter procedure and MiniFlatPack packaging. **Animal Reproduction Science**, v. 117, n. 3-4, p. 279–287, 2010.
- SCHAFER, J.; WABERSKI, D.; JUNG, M.; SCHULZE, M. Impact of holding and equilibration time on post-thaw quality of shipped boar semen. **Animal Reproduction Science**, v. 187, p. 109-115, 2017.
- SHAHVERDI, A.; RASTEGARNIA, A.; TOPRAGGALEH, T. R. Effect of extender and equilibration time on post thaw motility and chromatin structure of buffalo bull (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. **Cell Journal**, v. 16, p. 279-288, 2014.
- SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W. F. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. **Animal Reproduction Science**, v. 169, p. 2–5, 2016.
- SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v. 175, p. 720-731, 1972.

- TOMÁS, C.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J.; GÓMEZ-IZQUIERDO, E.; DE MERCADO, E. Effect of the holding time at 15°C prior to cryopreservation, the thawing rate and the post-thaw incubation temperature on the boar sperm quality after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 144, n. 3-4, p. 115–121, 2014.
- TORRES, M. A.; MONTEIRO, M. S.; PASSARELLI, M. S.; PAPA, F. O.; DELL'AQUA JÚNIOR, J. A.; ALVARENGA, M. A.; MARTINS, S. M. M. K.; ANDRADE, A. F. The ideal holding time for boar semen is 24 h at 17°C prior to short cryopreservation protocols. **Cryobiology**, v. 86, p. 58-64, 2019.
- TORRES, M. A.; RAVAGNANI, G. M.; LEAL, D. F.; MARTINS, S. M. M. K.; MEIRELLES, F. V.; PAPA, F. O.; ANDRADE, A. F. C. De. Seminal plasma arising from the whole boar sperm-rich fraction increases the stability of sperm membrane after thawing. **Journal of Animal Science**, p. 1–7, 2016.
- VILAGRAN, I.; CASTILLO, J.; BONET, S.; SANCHO, S.; YESTE, M.; ESTANVOL, J. M.; OLIVA, R. Acrosin-binding protein (ACRBP) and triosephosphate isomerase (TPI) are good markers to predict boar sperm freezing capacity. **Theriogenology**, v. 80, p. 443–450, 2013.
- VILAGRAN, I.; YESTE, M.; SANCHO, S.; CASAS, I.; RIVERA DEL ÁLAMO, M. M.; BONET, S. Relationship of sperm small heat-shock protein 10 and voltage-dependent anion channel 2 with semen freezability in boars. **Theriogenology**, v. 82, p. 418–426, 2014.
- VILAGRAN, I.; YESTE, M.; SANCHO, S.; CASTILLO, J.; OLIVAR, R.; BONET, S. Comparative analysis of boar seminal plasma proteome from different freezability ejaculates and identification of Fibronectin 1 as sperm freezability marker. **Andrology**, v. 3, n. 2, p. 345–56, 2015.
- VIYAKARN, V.; CHAVANICH, S.; CHONG, G.; TSAI, S.; LIN, C. Cryopreservation of sperm from the coral *Acropora humilis*. **Cryobiology**, v. 80, p. 13-138, 2018.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481–492, 2000.
- WATERHOUSE, K. E.; HOFMO, P. O.; TVERDAL, A.; MILLER, R. R. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. **Reproduction**, v.131, p. 887–94, 2006.
- YESTE, M.; ESTRADA, E.; CASAS, I.; BONET, S.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. Good and bad freezability boar ejaculates differ in the integrity of nucleoprotein structure after freeze-thawing but not in ROS levels. **Theriogenology**, v. 79, p. 929–939, 2013.
- YESTE, M.; ESTRADA, E.; PINART, E.; BONET, S.; MIRÓ, J.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. The improving effect of reduced glutathione on boar sperm cryotolerance is related with the intrinsic ejaculate freezability. **Cryobiology**, v. 68, n. 2, p. 251–261, 2014.
- YESTE, M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. **Theriogenology**, v. 85, p. 47-64, 2016.

YI, Y. J.; CHEON, Y. M.; PARK, C. S. Effect of N-acetyl-D-glucosamine, and glycerol concentration and equilibration time on acrosome morphology and motility of frozen-thawed boar sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 69, p. 91-97, 2002.

ZENG, C.; TANG, K.; HE, L.; PENG, W.; DING, L.; FANG, D.; ZHANG, Y. Effects of glycerol on apoptotic signaling pathways during boar spermatozoa cryopreservation. **Cryobiology**, v. 68, p. 395–404, 2014.

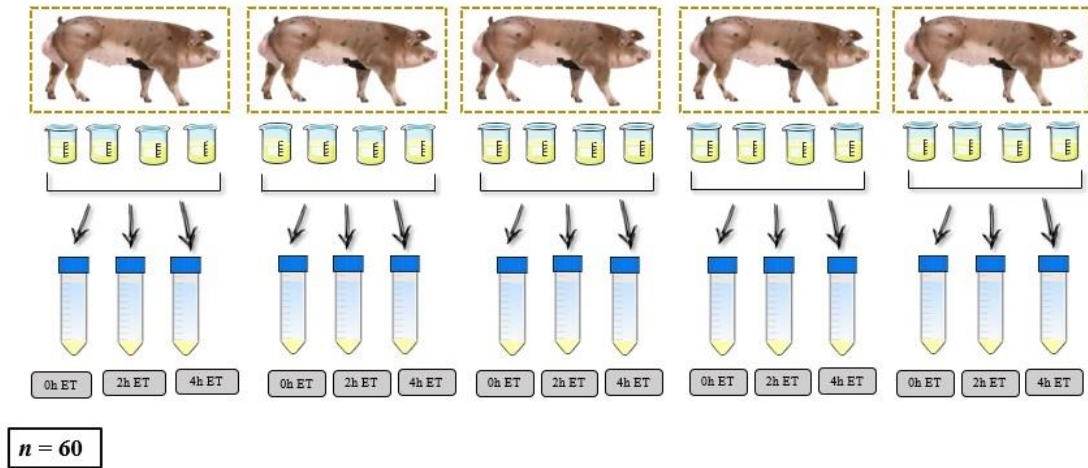


# APÊNDICES

---

## APÊNDICE A

**Figura 1.** Representative scheme of the experiment performed to determine the best equilibration time in the boar sperm cryopreservation protocol using the Two-step methodology



Fonte: PASSARELLI, M. S. (2019)

**Figura 2.** Coleta de sêmen suíno através do "método da mão enluvada"



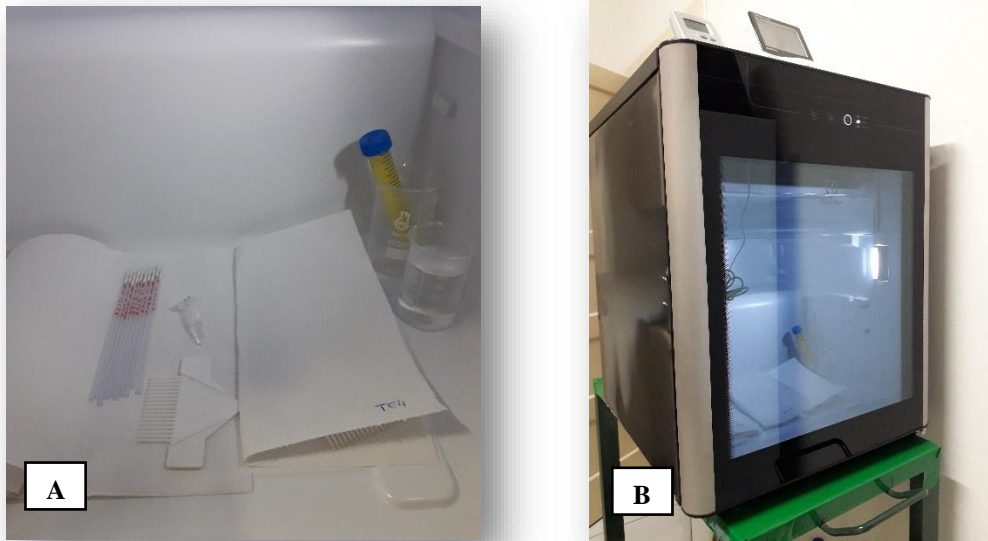
Fonte: PASSARELLI, M. S. (2018)

**Figura 3.** Amostras diluídas em BTS e armazenadas em tubos de 50 mL, submetidas ao holding time (17°C) por 24 horas. Pode-se observar também a refrigeração do tubo que seria destinado a diluição da fração A, tal como a mesma mediante a temperatura de 17°C



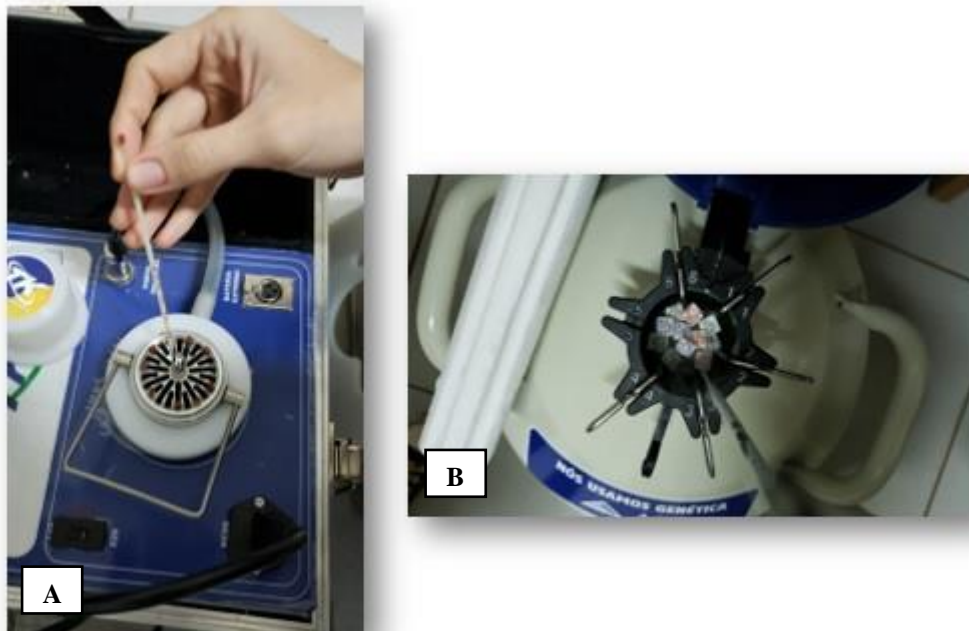
Fonte: PASSARELLI, M. S. (2018)

**Figura 4.** Materiais utilizados para a curva de refrigeração e congelação (A) em refrigerador doméstico comum (B) até os 5°C e subsequentes aplicações dos tempos de equilíbrios



Fonte: PASSARELLI, M. S. (2018)

**Figura 5.** (A) Palhetas já envasadas destinadas ao porta-palhetas do sistema automático de criopreservação, e (B) amostras armazenadas em botijão criogênico à -196°C



Fonte: PASSARELLI, M. S. (2018)

**Figura 6.** Materiais utilizados para a realização da análise computadorizada da cinética espermática (CASA)



Fonte: PASSARELLI, M. S. (2018)

## APÊNDICE B

**Table 1.** Mean  $\pm$  standard deviation post-thaw sperm quality parameters according to the different classifications groups and their respective equilibration times.

Parameter	Classification	Equilibration time		
		0h	2h	4h
% Total motile spermatozoa	GFE	27.33 $\pm$ 1.24 <sup>a,1</sup>	30.23 $\pm$ 2.76 <sup>a,1</sup>	24.17 $\pm$ 1.96 <sup>a,2</sup>
	PFE	13.22 $\pm$ 0.28 <sup>b</sup>	15.51 $\pm$ 0.45 <sup>b</sup>	14.53 $\pm$ 0.40 <sup>b</sup>
% Progressive motile spermatozoa	GFE	13.10 $\pm$ 0.83 <sup>a,1</sup>	15.60 $\pm$ 1.86 <sup>a,1</sup>	11 $\pm$ 1.09 <sup>a,2</sup>
	PFE	5.05 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	5.88 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>	5.42 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>
% Plasma and acrosome membrane integrity (PSA-/PI-)	GFE	38.14 $\pm$ 2.09 <sup>a</sup>	40.52 $\pm$ 4.15 <sup>a</sup>	38.03 $\pm$ 4.01 <sup>a</sup>
	PFE	17.47 $\pm$ 0.42 <sup>b,1</sup>	24.48 $\pm$ 0.40 <sup>b,2</sup>	38.03 $\pm$ 4.01 <sup>b,1</sup>
% Membrane lipid disorder (M540-/YP-)	GFE	13.60 $\pm$ 0.72	26.44 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	18.18 $\pm$ 3.44
	PFE	13.08 $\pm$ 0.33 <sup>1</sup>	15.40 $\pm$ 0.29 <sup>b,1</sup>	19.17 $\pm$ 0.51 <sup>2</sup>
% Mitochondrial membrane potential (JC-1 high potential)	GFE	22.28 $\pm$ 6.21	11.39 $\pm$ 1.50 <sup>a</sup>	22.02 $\pm$ 5.09
	PFE	33.85 $\pm$ 1.48	32.08 $\pm$ 0.72 <sup>b</sup>	23.31 $\pm$ 0.55
% Mitochondrial membrane potential (JC-1 moderate potential)	GFE	75.63 $\pm$ 6.57	88.18 $\pm$ 1.50 <sup>a</sup>	77.62 $\pm$ 5.08
	PFE	65.04 $\pm$ 1.48	67.45 $\pm$ 0.72 <sup>b</sup>	77.62 $\pm$ 0.55
% Lipid peroxidation	GFE	20.87 $\pm$ 1.37	29.06 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	16.32 $\pm$ 3.68

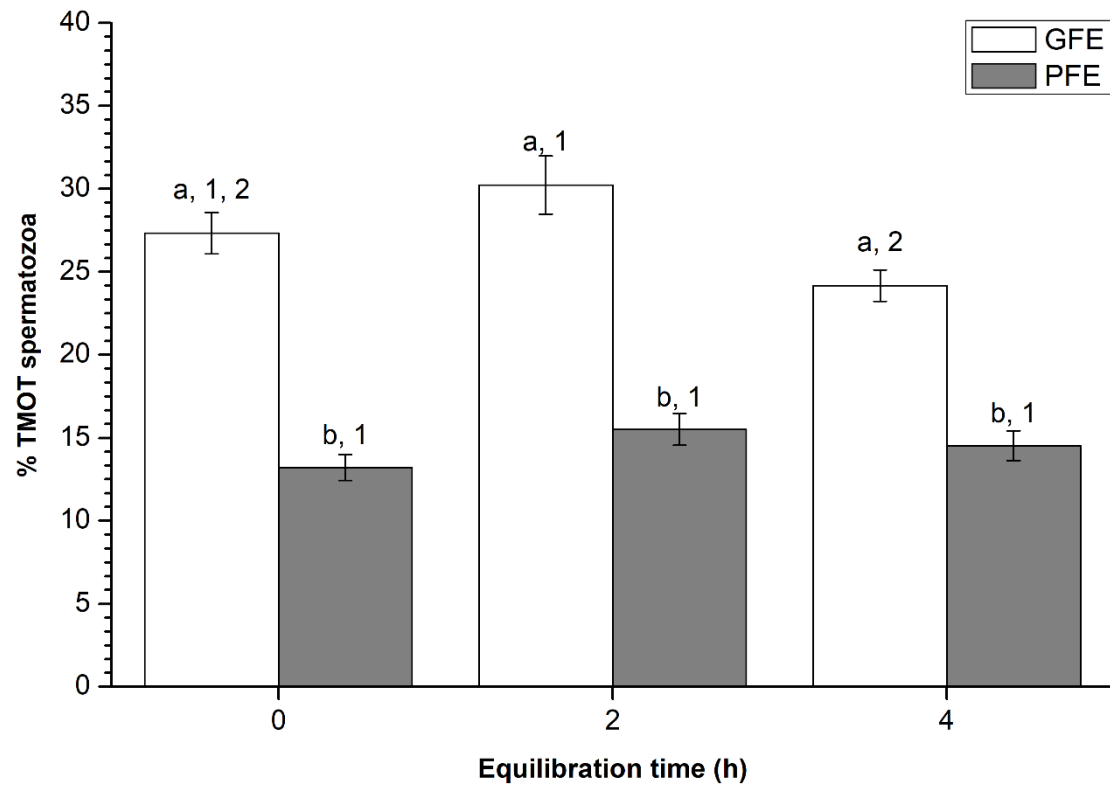
(BP+)	PFE	20.97 ± 0.99	17.06 ± 0.25 <sup>b</sup>	17.23 ± 0.58
% Intracellular superoxide levels (DHE+)	GFE	33 ± 2.28	36.22 ± 0.54 <sup>a</sup>	29.35 ± 3.08
	PFE	30.43 ± 0,65	28.39 ± 0,34 <sup>b</sup>	33.65 ± 0.51

Fonte: PASSARELLI, M. S. (2019)

GFE: Good freezability ejaculates; PFE: Poor freezability ejaculates; 0h: 0 hours equilibration time (at 5°C); 2h: 2 hours of equilibration time (at 5°C); 4h: 4 hours equilibration time (at 5°C). Different superscript letters (a, b) indicate significant differences ( $P \leq 0.05$ ) between GFE and PEF and their respective equilibration times (ET). Different superscript numbers (1,2,3) indicate significant differences ( $P \leq 0.05$ ) within the GFE and PEF groups and the applied equilibration times.

## APÊNDICE C

**Figura 7.** Mean  $\pm$  standard deviation of treatment effects on total motility characteristic (TMOT%) of boar sperm

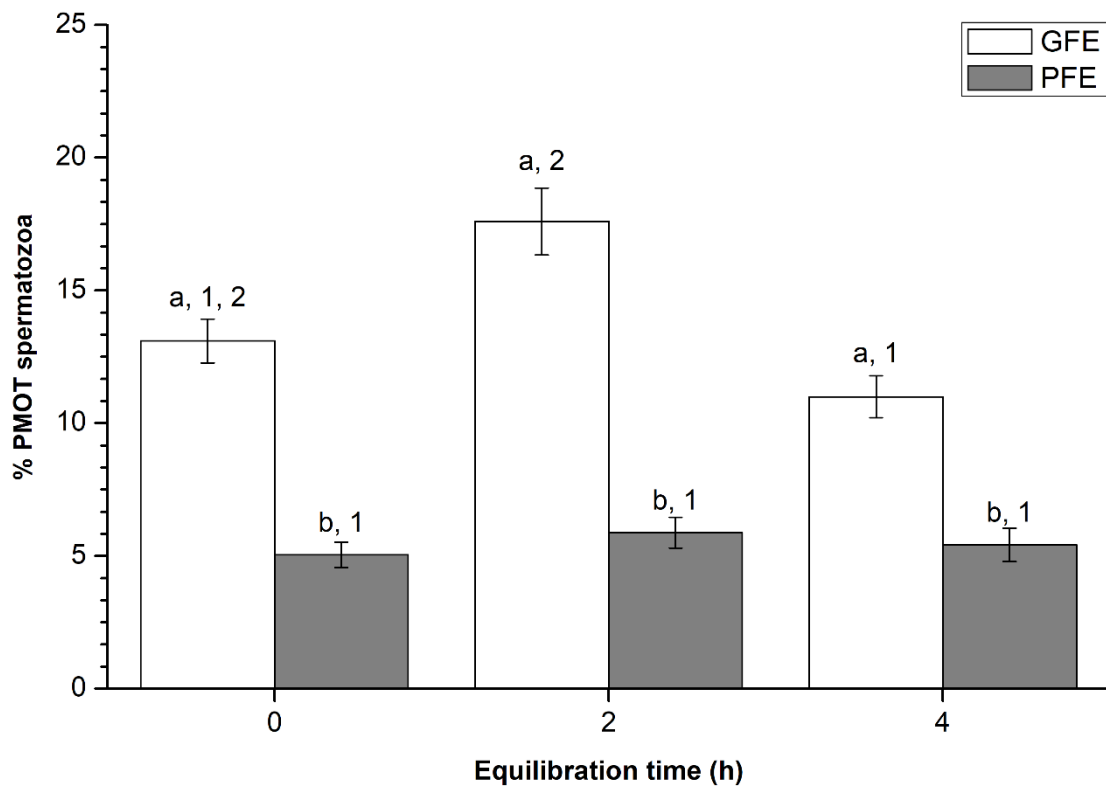


Fonte: PASSARELLI, M. S. (2019)

TMOT: Total motility; GFE: Good freezability ejaculates; PFE: Poor freezability ejaculates; 0h: 0 hours equilibration time (at 5°C); 2h: 2 hours of equilibration time (at 5°C); 4h: 4 hours equilibration time (at 5°C). Different superscript letters (a, b) indicate significant differences ( $P \leq 0.05$ ) between GFE and PEF and their respective equilibration times (ET). Different superscript numbers (1,2,3) indicate significant differences ( $P \leq 0.05$ ) within the GFE and PEF groups and the applied equilibration times.



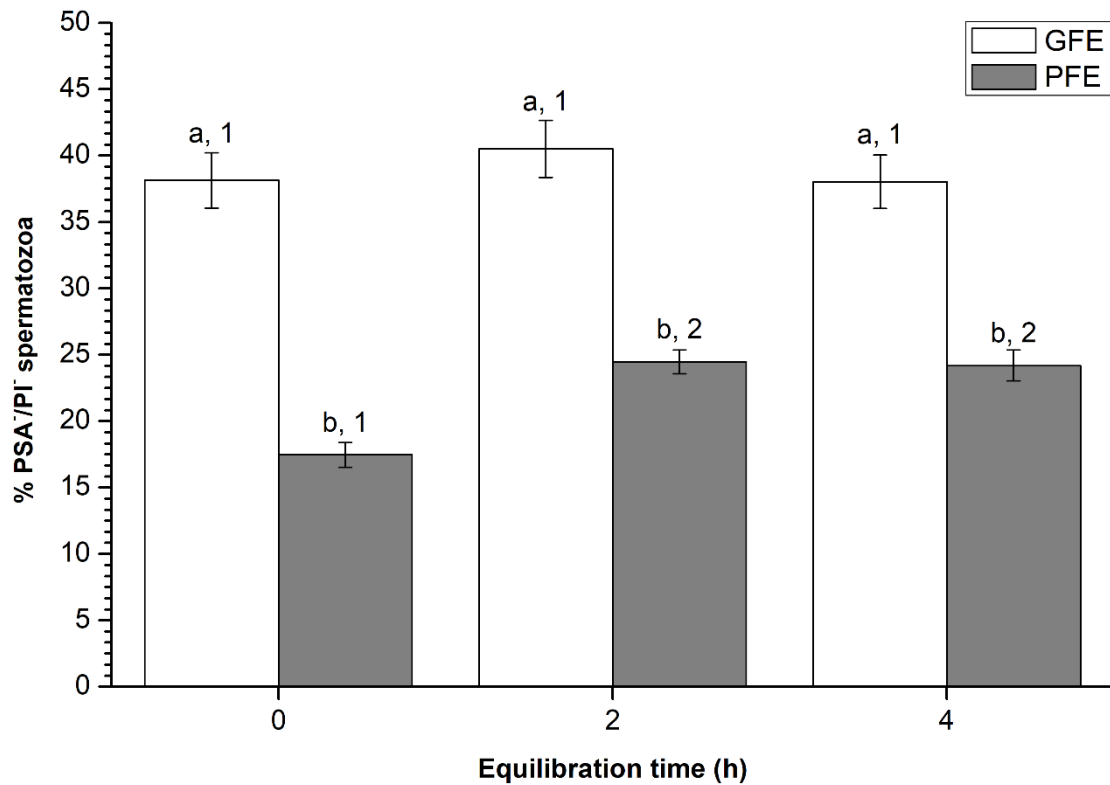
**Figura 8.** Mean  $\pm$  standard deviation of treatment effects on boar sperm progressive motility (PMOT%)



Fonte: PASSARELLI, M. S. (2019)

PMOT: Progressive motility; GFE: Good freezability ejaculates; PFE: Poor freezability ejaculates; 0h: 0 hours equilibration time (at 5°C); 2h: 2 hours of equilibration time (at 5°C); 4h: 4 hours equilibration time (at 5°C). Different superscript letters (a, b) indicate significant differences ( $P \leq 0.05$ ) between GFE and PEF and their respective equilibration times (ET). Different superscript numbers (1,2,3) indicate significant differences ( $P \leq 0.05$ ) within the GFE and PEF groups and the applied equilibration times.

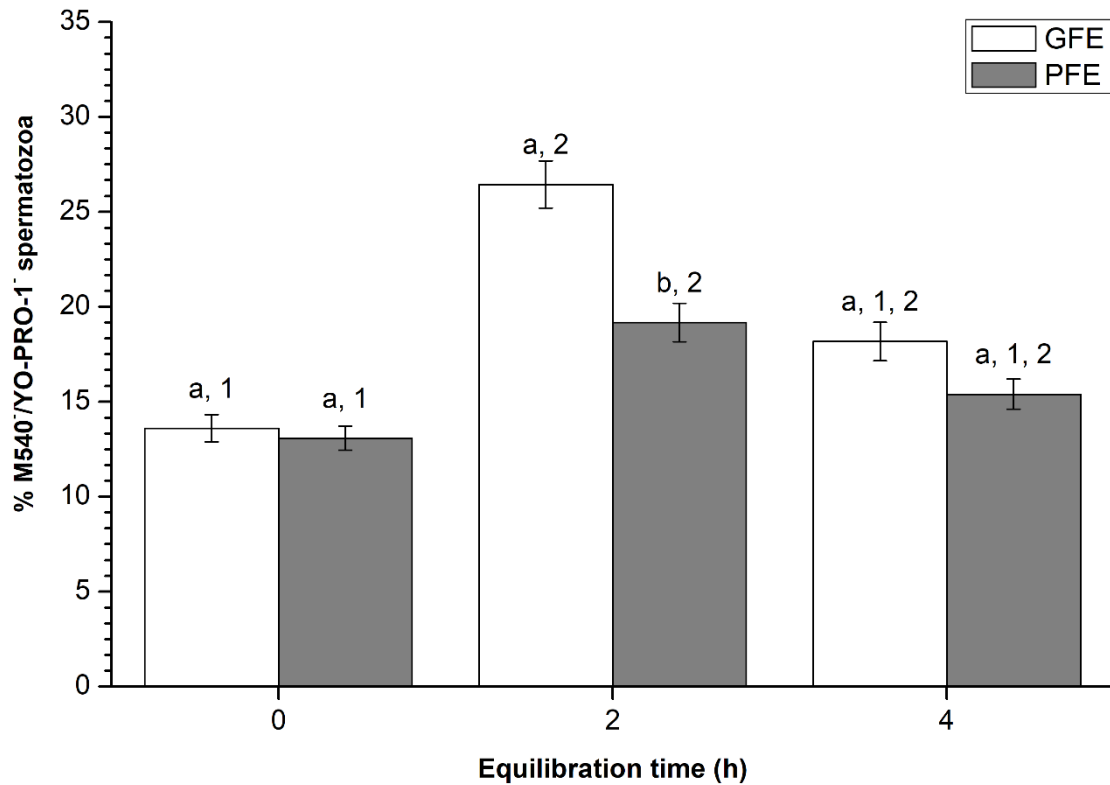
**Figura 9.** Mean  $\pm$  standard deviation of the effects of equilibration times on the integrity of the acrosomal and plasma membrane (% PSA-/PI-) of boar sperm



Fonte: PASSARELLI, M. S. (2019)

PSA: *Pisum sativum* agglutinin conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC); PI: Propidium iodide; GFE: Good freezability ejaculates; PFE: Poor freezability ejaculates; 0h: 0 hours equilibration time (at 5°C); 2h: 2 hours of equilibration time (at 5°C); 4h: 4 hours equilibration time (at 5°C). Different superscript letters (a, b) indicate significant differences ( $P \leq 0.05$ ) between GFE and PEF and their respective equilibration times (ET). Different superscript numbers (1,2,3) indicate significant differences ( $P \leq 0.05$ ) within the GFE and PEF groups and the applied equilibration times.

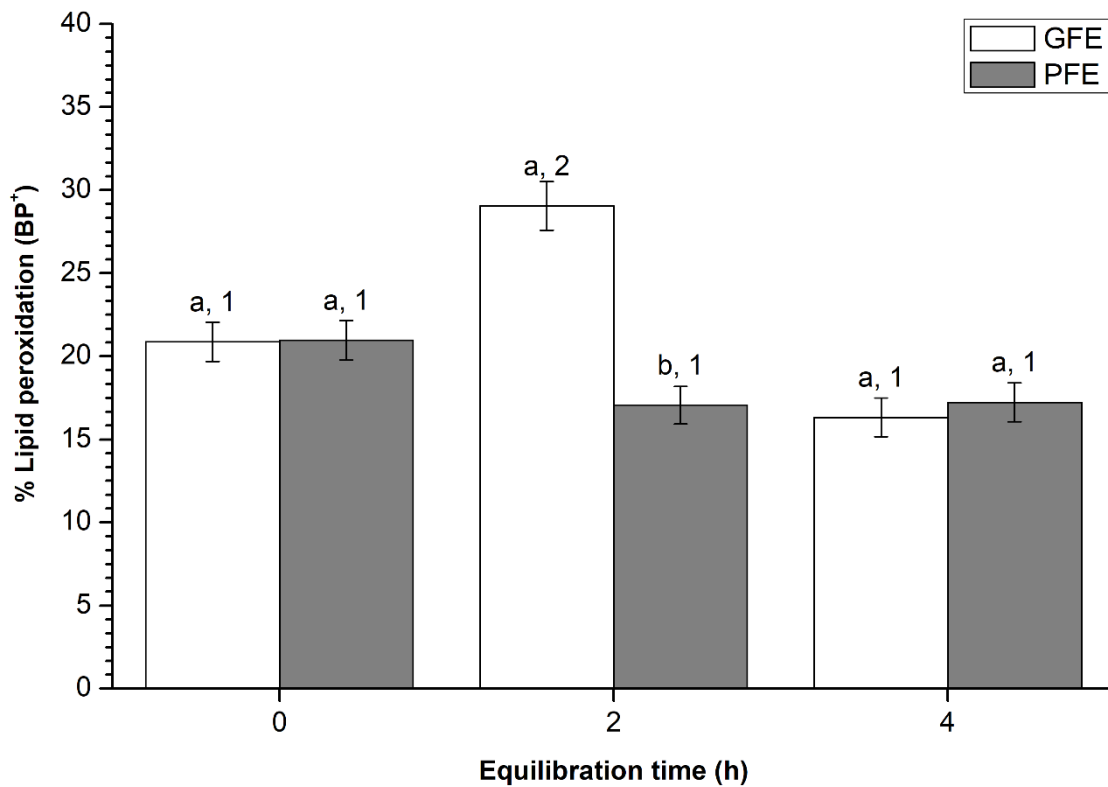
**Figura 10.** Mean  $\pm$  standard deviation of the effects of equilibration times on boar plasma membrane lipid disorder (% M540-/YO-PRO-1-)



Fonte: PASSARELLI, M. S. (2019)

M540: Merocianine 540; GFE: Good freezability ejaculates; PFE: Poor freezability ejaculates; 0h: 0 hours equilibration time (at 5°C); 2h: 2 hours of equilibration time (at 5°C); 4h: 4 hours equilibration time (at 5°C). Different superscript letters (a, b) indicate significant differences ( $P \leq 0.05$ ) between GFE and PEF and their respective equilibration times (ET). Different superscript numbers (1,2,3) indicate significant differences ( $P \leq 0.05$ ) within the GFE and PEF groups and the applied equilibration times.

**Figura 11.** Mean  $\pm$  standard deviation of the effects of equilibration times on lipid peroxidation in boar sperm plasma membrane (% BP-)



Fonte: PASSARELLI, M. S. (2019)

BP: C11-BODIPY<sup>581/591</sup>; GFE: Good freezability ejaculates; PFE: Poor freezability ejaculates; 0h: 0 hours equilibration time (at 5°C); 2h: 2 hours of equilibration time (at 5°C); 4h: 4 hours equilibration time (at 5°C). Different superscript letters (a, b) indicate significant differences ( $P \leq 0.05$ ) between GFE and PEF and their respective equilibration times (ET). Different superscript numbers (1,2,3) indicate significant differences ( $P \leq 0.05$ ) within the GFE and PEF groups and the applied equilibration times.

# ANEXOS

---

## ANEXO A

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

<b>Solução de sais de TALP</b> .....	10 mL
<b>Solução trabalho de metabólitos glicosados</b> .....	200 µL
<b>Albumina sérica bovina (BSA)</b> .....	100 mg

*Preparo:*

- I. Em um tubo Falcon, pesar a albumina sérica bovina (BSA);
- II. Dissolve-la nos sais de TALP, aliquotando na sequencia os metabólitos glicosados;
- III. Incubar por 10 minutos à 38°C;
- IV. Ajustar o pH para 7,40.

**1. Solução de sais de TALP (500mL)***Componentes:*

<b>NaCl</b> .....	2,100 g
<b>KCl</b> .....	0,935 g
<b>NaHCO<sub>3</sub></b> .....	1,050 g
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> .....	0,025 g
<b>CaCl<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O</b> .....	0,025 g
<b>MgCl<sub>6</sub>H<sub>2</sub>O</b> .....	0,040 g
<b>Hepes</b> .....	3,250 g

*Preparo:*

- I. Diluir inicialmente CaCl<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O e MgCl<sub>6</sub>H<sub>2</sub>O em 200mL de água Mili-Q;
- II. Os demais sais também deverão ser diluídos em água Mili-Q (200 mL), contudo separadamente da diluição I;
- III. Misturas as duas soluções em um recipiente, completando com água Mili-Q até completar 500 mL;

IV. Manter refrigerado à 5°C.

## 2. Solução de metabólitos glicosados

### 2.1. Solução estoque (500 mL)

*Componentes:*

<b>Glicose</b> .....	2,500 g
<b>Lactato de sódio</b> .....	9,250 mL
<b>Piruvato de sódio</b> .....	70 mg
<b>Pen-Strep</b> .....	12,500 mL

*Preparo:*

- I. Dissolver todos os componentes em um recipiente;
- II. Alíquotar 5 mL em um tubo Falcon;
- III. Manter congelado à -20°C.

### 2.2. Solução trabalho

*Preparo:*

- I. Em um tubo Falcon, pipetar 45 mL da solução de sais de TALP, ajustando seu pH para 7,40;
- II. Adicionar 5 mL da solução estoque de metabólitos glicosados anteriormente preparados;
- III. Filtrar em um filtro de  $\mu\text{m}$ ;
- IV. Em microtubos, alíquotar 300  $\mu\text{L}$ ;
- V. Manter congelado à -20°C.
- VI.

## ANEXO B

### PREPARO DOS FLUOROCROMOS

**Importante:** Sempre, ao armazenar os fluorocromos já diluídos, vedar os microtubos com papel alumínio, afim de evitar o contato com a luz.

### 1. Syto 59 (5 mM, Molecular Probers Inc., Eugene, Oregon – EUA)

*Preparo:*

- Diluir 5 mM do fluorocromo em 100  $\mu\text{L}$  de DMSO, objetivando-se uma concentração final de 5 nM.

#### 1.1. Solução estoque (500 $\mu\text{M}$ )

- Calculando:

$$\begin{array}{rclclcl} 5 \text{ mM} & \cdot & 100 \mu\text{L} & = & X \text{ Mm} & \cdot & 1000 \mu\text{L} \\ X & = & 0,50 \text{ mM} & \text{ ou } & 500 \mu\text{M} & & \end{array}$$

#### 1.2. Solução trabalho (750 nM)

- Calculando:

$$500 \mu\text{M} \cdot Y = 0,75 \mu\text{M} \cdot 1000 \mu\text{L}$$

$$Y = 1,50 \mu\text{L de solução estoque, diluída em } 998,50 \mu\text{L de DMSO}$$

Adicionar 1  $\mu\text{L}$  da solução trabalho, para se obter uma concentração final de 5 nM em 150  $\mu\text{L}$ .

### 2. FITC-PSA (100 $\mu\text{g/mL}$ , Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri – EUA)

- Calcular: 2 mg = 200  $\mu\text{g}$

$$100 \mu\text{g} \dots\dots\dots 1 \text{ Ml}$$

$$200 \mu\text{g} \dots\dots\dots X \qquad \qquad \qquad X = 20 \text{ mg}$$

*Preparo:*

- I. Deixar o fluorocromo FITC-PSA descongelar à temperatura ambiente;
- II. Adicionar 1 mL de PBS junto ao microtubo com o fluorocromo já descongelado;
- III. Homogeneizar em vórtex;
- IV. Transferir o conteúdo para um tubo Falcon de 50 mL, envolto por papel alumínio;
- V. Lavar o microtubo em que se encontrava o fluorocromo 5 vezes, com 1 mL de PBS cada vez, transferindo a lavagem em questão para o tubo Falcon;
- VI. Completar o mesmo com 14 mL de PBS.

### 3. Iodeto de propídeo (0,50 mg/mL, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri – EUA)

#### 3.1. Solução estoque (25 mg/mL)

*Preparo:*



- I. Em 1 mL de DMSO adicionar 25 mg de iodeto de propídeo, homogeneizando bem;
- II. Deixar sob incubação à temperatura ambiente por 10 minutos;
- III. Desta diluição, alíquotar em microtubos de 1,50  $\mu$ L;
- IV. Armazenar à uma temperatura de -20°C.

### 3.2. Solução trabalho (0,50 mg/mL)

#### *Preparo:*

- I. Em 20  $\mu$ L de iodeto de propídeo (solução estoque de 25 mg/mL), diluir 980  $\mu$ L de PBS;
- II. Desta diluição, alíquotar 60  $\mu$ L em microtubos de 0,60 mL;
- III. Armazenar à uma temperatura de -20°C.

## 4. JC-1 (153 $\mu$ M, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon – EUA)

### 4.1. Solução estoque (1,53 $\mu$ M)

#### *Preparo:*

- I. Diluir em 5 mL de DMSO todo o conteúdo do microtubo de JC-1;
- II. Homogeneizar bem;
- III. Manter 5 minutos em descanso antes de realizar a próxima etapa (solução trabalho).

### 4.2. Solução trabalho (153 $\mu$ M)

#### *Preparo:*

- I. Da solução estoque, pipetar 100  $\mu$ L em um novo microtubo;
- II. Diluir em 900  $\mu$ L de DMSO;
- III. Homogeneizar bem;
- IV. Alíquotar em microtubos de 0,60 mL, encobertos com papel alumínio;
- V. Conservar à -20°C.

## 5. Yo-Pro-1 (7,50 $\mu$ M, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon – EUA)

#### *Preparo (Para a avaliação de 400 amostras):*

- I. Diluir 1,50  $\mu$ L de solução de YP (1000  $\mu$ M), em 198,50  $\mu$ L de DMSO;
- II. Alíquotar 20  $\mu$ L em microtubos (solução final de 7,50  $\mu$ M).

## 6. Merocianina 540 (810 $\mu$ M, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon – EUA)

- Calculando:

$$\text{I. } X \cdot 1 \mu\text{L} = 150 \mu\text{L} \cdot 0,675 \mu\text{M}$$

$$X = 101,25 \mu\text{M}$$

$$\text{II. } 810 \mu\text{M} \cdot Y = 101,25 \mu\text{M} \cdot 1000 \mu\text{L}$$

$$X = 125 \mu\text{L} (810 \mu\text{M}) -$$

Considerando o volume total de 1000  $\mu\text{L}$ , deve-se diluir 125  $\mu\text{L}$  de solução trabalho, que contém 810  $\mu\text{M}$ , em 875  $\mu\text{L}$  de DMSO.

**7. C11-BODIPY<sup>581/591</sup> (1 mg/mL, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon – EUA)**

- Solução trabalho já vem preparada com 2 mM em 1 mL;
- Alíquotar 10  $\mu\text{L}$  em microtubos de 0,60 mL (20 microtubos no total);
- Vedar a tampa com parafilm<sup>®</sup> e armazenar à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**8. Dihidroetídio – DHE (5 mM, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon – EUA)**

- Objetiva-se 2,40  $\mu\text{M}$  na solução final, desta forma calculando:

$$150 \mu\text{L} \cdot 2,40 \mu\text{M} = 1 \mu\text{L} \cdot X$$

$$X = 360 \mu\text{M} \text{ (Concentração que estará presente na solução trabalho)}$$

- Solução à 5 mM

$$5 \text{ mM} \cdot X = 1000 \mu\text{L} \cdot 0,36 \text{ Mm}$$

$$X = 72 \mu\text{L de DHE}$$

Objetivando-se um volume final de 1000  $\mu\text{L}$ :

$$1000 \mu\text{L} - 72 \mu\text{L de DHE} = 928 \mu\text{L de DMSO}$$