

MARIANA ANDRADE TORRES

Assinaturas metabolômicas da influência do *holding time* sobre o aumento da criotolerância dos espermatozoides suínos

São Paulo

2020

MARIANA ANDRADE TORRES

Assinaturas metabolômicas da influência do *holding time* sobre o aumento da criotolerância dos espermatozoides suínos

Tese 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 Doutor em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. André Furugen Cesar de Andrade

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2020

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

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3880
FMVZ

Torres, Mariana Andrade
Assinaturas metabólicas da influência do *holding time* sobre o aumento da
criotolerância dos espermatozoides suínos / Mariana Andrade Torres. – 2019.
104 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2020.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

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

Coorientador: Prof. Dr. Heidge Fukumasu.

1. Metabólica. 2. Sêmen. 3. Plasma seminal. 4. Criopreservação. 5. Congelabilidade.
I. Título.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Assinaturas metabolômicas da influência do holding time sobre o aumento da criotolerância dos espermatozoides suínos", protocolada sob o CEUA nº 5664140316 (ID 002636), sob a responsabilidade de **André Furugen César de Andrade e equipe; Mariana Andrade Torres** - 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 15/08/2016.

We certify that the proposal "Metabolomics signatures on the influence of holding time on increasing boar spermatozoa cryotolerance", utilizing 56 Swines (56 males), protocol number CEUA 5664140316 (ID 002636), under the responsibility of **André Furugen César de Andrade and team; Mariana Andrade Torres** - 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 08/15/2016.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [04/2016](#) a [11/2019](#) Área: [Reprodução Animal](#)

Origem: [Não aplicável biotério](#)

Espécie: [Suínos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [1 a 3 anos](#)

N: [6](#)

Linhagem: [Cruzamento](#)

Peso: [220 a 320 kg](#)

Origem: [Não aplicável biotério](#)

Espécie: [Suínos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [1 a 3 anos](#)

N: [50](#)

Linhagem: [DB Genética Suína- LM 6200® e/ou LI](#)

Peso: [220 a 340 kg](#)

Local do experimento: Núcleo de Pesquisa em Suínos (FMVZ/USP - campus Fernando Costa) e DB genética Suína - Patos de Minas (MG)

São Paulo, 21 de outubro de 2019

Profa. Dra. Anneliese 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: TORRES, Mariana Andrade

Título: Assinaturas metabolômicas da influência do *holding time* sobre o aumento da criotolerância dos espermatozoides suínos

Tese 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 Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Sem o amor, a dedicação, carinho, persistência, paciência, nada disso seria possível. Esse trabalho é inteiramente dedicado a vocês que são minha base, meu alicerce, minha razão e meu viver

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à **Deus** pelo dom da vida, e por ter me concedido uma segunda oportunidade de vive-la.

Aos meus pais **Mônica** e **Djalma** o meu muito obrigada por sempre estarem do meu lado, me apoiarem e me ajudarem em tudo que eu precisei, vocês são tudo pra mim e sem vocês eu não seria D.O197o do que sou hoje, vocês são meu espelho para tudo. Amo vocês até o infinito!

Aos meus irmãos **Matheus**, **Mathias** e **Maristela**, muito obrigada por sempre estarem presentes mesmo na distância e por estarem com os pais enquanto eu estou longe. É o meu mais sincero agradecimento pelos melhores presentes que vocês poderiam me dar, seus filhos, meus sobrinhos. Amo vocês.

Aos meus sobrinhos **Julia**, **Maria Clara**, **João Pedro** (*in memoriam*), **Gabrielle**, **Gabriel** (meu afilhado), **Maria Alice**, **Vitor** e **Maria Luísa**, vocês são a luz da minha vida. Tudo que eu faço é pensando que um dia vocês possam olhar e se inspirar; que eu possa sempre ensinar algo para vocês como vocês me ensinam sempre. Amo vocês.

A quem dá luz à todos os meus dias, que sempre me esperou na porta, que me faz feliz somente por um RonRon. **Lucy**, você colocou cor na minha vida com o seu preto e branco.

Aos meus avôs **Luiz** (*in memoriam*) e **Djalma** (*in memoriam*), e as minhas avós **Benedita** (*in memoriam*) e **Hilda**, obrigada por serem e terem sidos avós maravilhosos, e obrigada por terem dado ao mundo as duas pessoas que eu mais amo. Amo vocês aqui na Terra e lá no Céu.

As minhas cunhadas **Soraya** e **Gleice** e ao meu cunhado **Kiko**, obrigada por estarem com meus irmãos e sobrinhos, e cuidarem tão bem deles quando eu não posso estar por perto.

Ao meu namorado **Marcos** obrigada por estar comigo todo os dias, me entender tão bem, e me ajudar em absolutamente tudo desde de conversas, a instalar e arrumar coisas, a fazer uma mesa, ou brinquedos pra Lucy, ou mesmo me ajudar com as coisas do doutorado, e digo sem medo nenhum de estar errada, esses 4 anos de doutorado teriam sido muito mais longo se você não tivesse comigo em 3 deles. Te amo demais!

Aos meus amigos que tornaram essa caminhada mais fácil de alguma maneira **Valéria** e **Sabrina** obrigada pela amizade, conversas longas e conselhos. À **Cacau** e a **Rafa** obrigada por mesmo com tanta distância e tanto tempos sem nos vermos continuarmos conversando e mantendo essa amizade. Às minhas amigas e companheiras de casa **Robertinha**, **Mariane**, **Verônica** e

Victória obrigada pelas conversas aleatórias, pelos momentos de forças, pelas comidinhas compartilhadas, por me deixarem ganhar no UNO e pelos papéis alternativos.

A todos os funcionários da Unidade de Difusão Genética da DB-genética Suína em Presidente Olegário o meu sincero agradecimento por toda ajuda durante o período de coleta. **Antônio, Stela, Patrícia, Dino, Maykon, Jefferson** e ao médico veterinário **Dr. Diego Alkmin**.

A todos do Discovery Park da Purdue University que colaboraram para a realização desse experimento. **Christina Ramires, Uma Aryal, Bruce Cooper** e **Victória Hedrick**.

A todos que de alguma maneira fizeram meu estágio BEPE mais feliz e fácil. Obrigada à minha amiga **Ilka**, você tornou todos os dias melhores e mais divertidos, obrigada pelas conversas, cafés e saídas para comer e divertir, e por ter me ensinado tanto. Thanks **Jillian, Hayly, Katharine** and **Eunice** you girls made my lunch time and every free time we had so special, thank you for the friendship! Obrigada ao "Mister Breast Cancer" **Ramon** pela companhia, amizade e coffee time com horas de brainstorm.

Aos membros do **Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos** obrigada por toda ajuda e principalmente à **Ana Carolina**, muito obrigada pela ajuda na coleta das amostras e no processamento e extração, sem você esse trabalho não teria sido possível.

À **Dra. Maira Bianchi** pela amizade, por ter me acompanhado nos meus primeiros passos dentro de um laboratório de andrologia e por ter me ensinado muito do que eu sei hoje.

Ao professor **Dr. Zoltan Machaty** por ter me recebido em seu laboratório de portas abertas e ter sido tão receptivo. Thank you!

Ao professor **Dr. Flávio Viera Meirelles** por ter aberto as portas do laboratório e pela confiança com o citômetro de fluxo.

Ao Professor **Dr. George Shigueki Yasui** por ter aberto as portas do laboratório e pela confiança com o citômetro de fluxo.

À Professora **Dra. Eneiva Carla** por sempre estar de portas abertas e colaborar com nosso laboratório, e por confiar em nosso trabalho para colaborações; e a equipe do **LEPPAR**.

Ao Professor **Dr. Heidge Fukumasu** pela coorientação nesse trabalho, ao seu ex-orientado **Francisco José Novais** pela ajuda com o projeto e com a análise de bioinformática, e também a **Arina Rochetti** pelo auxílio no processamento das amostras.

Ao Professor **Dr. André Andrade** pela orientação, confiança, amizade, pelas longas conversas conselhos, dicas e por ter me inserido nesse mundo maravilhoso da pesquisa o meu sincero muito obrigada.

Às secretárias do departamento Harumi, Thais e Roberta e ao secretário Clayton, muito obrigada por toda a cooperação e presteza em todos os momentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal, à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e à Universidade de São Paulo pela oportunidade do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – (CNPq)

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa 2016/24690-4, pela bolsa de doutorado no país concedida no processo 2016/09441-8 e a possibilidade de intercâmbio pelo programa BEPE com o processo 2018/03924-2.

“Ando devagar
Porque já tive pressa
E levo esse sorriso
Porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte
Mais feliz quem sabe
Só levo a certeza
De que muito pouco eu sei
Ou nada sei
(...)”

Renato Teixeira, 1991

RESUMO

TORRES, M. A. **Assinaturas metabôlicas da influência do *holding time* sobre o aumento da criotolerância dos espermatozoides suínos**. 2019. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A criopreservação do sêmen suíno ainda é um grande desafio em decorrência de diferenças no potencial de criotolerância dos ejaculados que influenciam a qualidade do sêmen descongelado. O *holding time* (HT) é uma alternativa utilizada nos protocolos de criopreservação para melhorar a qualidade do sêmen descongelado, é caracterizado pela refrigeração do sêmen à 17 °C anterior à criopreservação. Entretanto, não se sabe o período ideal de manutenção dessa refrigeração. Durante esse período ocorrem interações não conhecidas entre os espermatozoides e o plasma seminal (e diluidor) que podem alterar o potencial de criotolerância de forma distinta entre ejaculados de alta e baixa congelabilidade. Para tentar compreender essas interações, a utilização da metabolômica como ferramenta molecular é essencial, já que a metabolômica é considerada o fenótipo bioquímico das células/fluídos em determinado momento. O presente estudo teve como objetivo 1) verificar qual o período de HT ideal para criopreservação; 2) verificar se a congelabilidade dos ejaculados é afetada pelo uso do HT; e 3) averiguar os efeitos do HT sobre a congelabilidade dos ejaculados no metaboloma dos espermatozoides e do plasma seminal (PS) de suínos. No primeiro estudo, o sêmen foi criopreservado utilizando sete diferente período de HT (0, 4, 8, 12, 24, 28 e 32 horas). Os resultados do sêmen descongelado mostraram que para a motilidade total e progressiva e para a integridade das membranas plasmática e acrossomal os melhores resultados foram obtidos com 24 horas de HT. Para o segundo estudo foi feita uma coleta de cada um dos 27 cachaços. Estes ejaculados foram criopreservados com (24 horas) e sem (0 horas) o uso de HT; após cada período de HT (0 e 24 horas) o PS e os espermatozoides foram separados para posterior análise do metaboloma. Do total de ejaculados cinco foram classificados como de alta (EAC) e cinco como de baixa (EBC) congelabilidade com base na perda de motilidade total e integridade de membrana plasmática. Foi observado interação entre o uso de HT e a congelabilidade dos ejaculados, ou seja, os EAC somente são capazes de demonstrar esse potencial se criopreservados após 24 horas à 17 °C. Ainda, foram realizadas as análises metabolômicas do PS e dos espermatozoides antes e após o HT dos EAC e EBC. Com essas análises foi possível descrever que a assinatura metabolômica dos espermatozoides é decorrente das diferenças de congelabilidade inerentes ao ejaculado, caracterizada pelas alterações de abundância de alguns metabolitos entre os grupos

experimentais. Já a assinatura metabolômica do PS é decorrente das diferenças intrínsecas ao HT, caracterizada pelas alterações na abundância dos metabólitos entre os ejaculados que passaram ou não por HT. Com isso, é possível que a interação entre as diferenças dos metabólitos dos espermatozoides e do PS pode ser responsável por explicar os resultados observados na fisiologia dos espermatozoides descongelados.

Palavras-chave: Metabólitos. Sêmen. Plasma seminal. Criopreservação. Congelabilidade.

ABSTRACT

TORRES, M. A. **Metabolomics signatures on the influence of holding time on increasing boar spermatozoa cryotolerance**. 2019. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Cryopreservation of boar semen is still a major challenge due to differences in the cryotolerance potential of ejaculates influencing post-thawed semen quality. Holding time (HT) is an alternative used in cryopreservation protocols to improve the quality of thawed semen, it is characterized by semen refrigeration at 17 ° C before cryopreservation. However, the ideal period of holding is unknown. During this period, unknown interactions occur between spermatozoa and seminal plasma (and extender) that can alter the cryotolerance potential differently between high and low freezing ejaculates. To understand these interactions, the use of metabolomics as a molecular tool is essential, since metabolomics is considered the biochemical phenotype of cells/fluids at a given time. The present study aimed to 1) verify which is the ideal HT period for cryopreservation; 2) check if ejaculate freezability is affected by the use of HT; and 3) investigate the effects of HT on the ejaculate freezability on the metabolome of spermatozoa and seminal plasma (SP). For the first study, the semen was cryopreserved using seven different HT periods (0, 4, 8, 12, 24, 28 e 32 hours). The results of thawed semen showed that for total and progressive motility and the integrity of the plasma and acrosomal membranes, the best results were obtained after 24 hours of HT. For the second study, one sperm-rich fraction was collected from each of the 27 boars. These ejaculates were cryopreserved with (24 hours) and without (0 hours) the use of HT. After each HT period (0 and 24 hours) the SP and the spermatozoa were separated for further analysis of the metabolome. Of the total ejaculates, five were classified as high (EAC) and five as low (EBC) freezability based on the loss of total motility and integrity of the plasma membrane. An interaction was observed between the use of HT and the freezing of ejaculates, that is, EACs are only able to demonstrate their freezability potential if cryopreserved after 24 hours at 17 ° C. Also, metabolomic analyzes of PS and spermatozoa were performed before and after HT of EAC and EBC. It was possible to describe that the sperm's metabolomic signature is due to the differences in freezability inherent to the ejaculate, characterized by changes in the abundance of some metabolites between the experimental groups. The SP metabolomic signature is characterized by the intrinsic differences to HT, characterized by changes in the abundance of metabolites between ejaculates cryopreserved with or without HT. Thus, the interaction

between the differences in the metabolites of sperm and PS may be responsible for explaining the results observed in the physiology of thawed sperm.

Keywords: Metabolomics. Semen. Seminal plasma. Cryopreservation. Freezability.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Esquema do protocolo longo de criopreservação atualmente utilizado e baseado no protocolo descrito por Westerndorf (1975).....22
- Figura 2 - Diagrama ilustrando o posicionamento do metaboloma dentro do diagrama de proximidade das “ômicas” com o fenótipo.....26
- Figura 3 - Esquema ilustrativo do delineamento experimental para os diferentes tempos de HT.....36
- Figura 4 - Média (\pm EPM) das características de membrana espermática pós-descongelção dos diferentes tempos de manutenção à 17 °C no protocolo de criopreservação do sêmen suíno.....41
- Figura 5- Média (\pm EPM) das características do estado oxidativo das membranas espermáticas pós-descongelção dos diferentes tempos de manutenção à 17 °C no protocolo de criopreservação do sêmen suíno.....42
- Figura 6 - Características da motilidade espermática pós-descongelção dos ejaculados de alta (EAC; \blacktriangle) e baixa (EBC; \blacksquare) congelabilidade em protocolos com e *sem holding time* à 17 °C anterior à criopreservação.....66
- Figura 7 - Características das membranas espermáticas pós-descongelção dos ejaculados de alta (EAC; \blacktriangle) e baixa (EBC; \blacksquare) congelabilidade com e sem adição de período de *holding time* à 17 °C anterior à criopreservação.....69
- Figura 8 – Representações gráficas das análises multivariadas (A) Análise de componente principal e (B) Análise discriminante de mínimos quadrados parciais das amostras de espermatozoides suínos.....70
- Figura 9 – Representação gráfica (A) das variáveis importantes em projeção (VIP) e da (B) análise de *heat-map* metabólitos presentes nos espermatozoides de suínos.....73
- Figura 10 – Representações gráficas das análises multivariadas (A) Análise de principal componente (PCA) e (B) Análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) das amostras de plasma seminal suínos.....74
- Figura 11 – Representação gráfica (A) das variáveis importantes em projeção (VIP) e da (B) análise de *heat-map* metabólitos presentes nos espermatozoides de suínos.....76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média (\pm EPM) das características de motilidade pós-descongelção dos diferentes tempos de manutenção à 17 °C no protocolo de criopreservação do sêmen suíno....	40
Tabela 2: Caracterização da diferença de congelabilidade entre os ejaculados considerados de alta congelabilidade (EAC) e de baixa congelabilidade (EBC) pelo índice de descongelção (<i>idesc</i>).	63
Tabela 3 - Qualidade in natura dos ejaculados considerados bons e maus congeladores e a média de todos os ejaculados congelados durante a fase experimental.....	64
Tabela 4 - Qualidade pós-refrigeração à 17 °C dos ejaculados considerados bons e maus congeladores e a média de todos os ejaculados congelados durante a fase experimental.....	65
Tabela 5 - Média \pm EPM das variáveis da cinética espermática pós-descongelção dos ejaculados de alta (EAC) e baixa (EBC) congelabilidade com e sem adição de holding time à 17 °C anterior à criopreservação.....	67
Tabela 6 – Identificação dos analitos detectados nos espermatozoides de suínos com Variável Importante em Projeção (VIP) maior que 2.....	72
Tabela 7 – Identificação dos analitos detectados no plasma seminal de suínos com Variável Importante em Projeção (VIP) maior que 2.....	75

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1	A CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA E O USO DO <i>HOLDING TIME</i>	23
2.2	A INFLUÊNCIA DO INDIVÍDUO NA CONGELABILIDADE DOS ESPERMATOZOIDES SUÍNOS.....	25
2.3	A METABOLÔMICA E A PROCURA DE MARCADORES NA ANDROLOGIA.....	26
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	OBJETIVO GERAL.....	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4	HIPÓTESES.....	30
5	ARTIGO I: O <i>holding time</i> ideal para a criopreservação do sêmen suíno é de 24 horas à 17 °C.....	31
5.1	INTRODUÇÃO.....	31
5.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
5.2.1	Delineamento experimental.....	33
5.2.2	Reagentes.....	33
5.2.3	Coleta e análise <i>in-natura</i> do sêmen suíno.....	33
5.2.4	Criopreservação e descongelação do sêmen suíno.....	34
5.2.5	Análises pós-descongelação.....	34
5.2.5.1	Análise da cinética espermática.....	34
5.2.5.2	Análise do estado fisiológico das membranas espermáticas.....	35
5.2.6	Análise Estatística.....	37
5.3	RESULTADOS.....	38
5.3.1	Cinética espermática.....	38
5.3.2	Estado fisiológico das membranas espermáticas.....	38
5.4	DISCUSSÃO.....	43
	REFERÊNCIAS.....	47
6	ARTIGO II: O potencial de congelabilidade do ejaculado suíno e sua relação com o uso do <i>holding time</i> anterior a criopreservação: Uma visão metabólica.....	54

6.1	INTRODUÇÃO.....	54
6.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	55
6.2.1	Desenho experimental.....	55
6.2.2	Reagentes.....	56
6.2.3	Animais e local.....	56
6.2.4	Avaliação seminal à campo.....	57
6.2.5	Criopreservação e descongelação seminal.....	57
6.2.6	Análises pós-descongelação.....	58
6.2.6.1	Avaliação da cinética espermática.....	58
6.2.6.2	Avaliação do estado fisiológico das membranas espermáticas.....	59
6.2.7	Determinação da congelabilidade dos ejaculados.....	60
6.2.8	Coleta das amostras e protocolo de extração dos metabólitos.....	60
6.2.9	Análise metabolômica não direcionada.....	61
6.2.10	Análise estatística.....	62
6.2.11	Bioinformática.....	62
6.3	RESULTADOS.....	63
6.3.1	Caracterização da diferença de congelabilidade entre os ejaculados.....	63
6.3.2	Qualidade dos ejaculados <i>in natura</i> e pós-<i>holding time</i>.....	63
6.3.3	Características de motilidade dos espermatozoides suínos pós-descongelação por sistema computadorizado.....	65
6.3.4	Características das membranas espermáticas por citometria de fluxo.....	68
6.3.5	Análise do metaboloma dos espermatozoides de ejaculados de alta e baixa congelabilidade criopreservados após 0 e 24 horas de <i>holding time</i>.....	69
6.3.6	Análise do metaboloma do plasma seminal de ejaculados de alta e baixa congelabilidade criopreservados após 0 e 24 horas de <i>holding time</i>.....	73
6.4	DISCUSSÃO.....	76
	REFERÊNCIAS.....	80
7	CONCLUSÕES.....	88
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	89
9	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	90
	REFERÊNCIAS.....	91
	APÊNDICE A.....	98

1 INTRODUÇÃO

O Brasil conta com um plantel de 1,7 milhões de matrizes suínas (ABCS, 2016) das quais aproximadamente 90 % passa pelo processo de inseminação artificial (IA; RODRÍGUEZ-GIL; ESTRADA, 2013). Do total de inseminações realizadas apenas 1 % é realizado com sêmen criopreservado (YESTE, 2015). Essa baixa exploração do uso do sêmen congelado na suinocultura industrial é consequência dos danos estruturais e funcionais as membranas espermáticas, oxidação dos lipídios e do material genético, alteração na estrutura e organização da membrana plasmática; danos que são inerentes ao processo, e geram, por consequência, a diminuição do potencial fertilizante dessas células após a descongelação diminuindo o número de leitões por leitegada (JOHNSON et al., 2000). Com isso, a utilização do sêmen criopreservado na suinocultura, está restrito à empresas produtoras de genética para a produção de bancos de genes, conservação da diversidade genética e segurança no caso de perda de machos de alto potencial genético, além de incorporação de genes superiores no rebanho e comercialização de genética no mercado internacional (SARAVIA, 2008).

A primeira IA bem-sucedida, em suínos, com sêmen criopreservado foi realizada em 1971 por Crabo e Einarsson. Desde então, o protocolo de criopreservação do sêmen suíno vem sendo modificado a fim de simplificar os processos de criopreservação e descongelação, diminuir o volume de sêmen congelado (utilização de diferentes tipos de palhetas de criopreservação), diminuição do número de espermatozoides/ mL, dentre outras alternativas. Em 1975, Pursel e Johnson propuseram a técnica de criopreservação em pellets de 0,15 a 0,20 mL em gelo seco. No mesmo ano, Westendorf e colaboradores propuseram o método de criopreservação do sêmen suíno em nitrogênio líquido utilizando palhetas de 6 mL. Apesar de algumas mudanças terem sido estabelecidas em relação a taxa de refrigeração e descongelação, entre outros, o protocolo base de criopreservação do sêmen suíno num geral permanece o mesmo há mais de 40 anos.

Brevemente, essa técnica descrita por Westendorf (1975) (aqui denominada como protocolo longo) e com algumas adaptações de diferentes autores (Figura 1), consiste na coleta do sêmen suíno pela técnica da mão enluvada, sendo que a coleta apenas da fração rica do ejaculado é ideal (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 2011). Após a coleta o sêmen é diluído (1:1 até 1:5) em diluente de refrigeração (diluente I - BTS, Bestville Thawing Solution) e mantido em temperatura ambiente por 1,5 horas (ALMLID et al., 1987). Em seguida o sêmen é refrigerado à 15 °C por no mínimo 3 horas (período denominado *holding time* [HT], YESTE et al., 2014). Após o HT o sêmen diluído é centrifugado 800 g/ 10 min (ou 2400 g/ 3 min;

CARVAJAL et al., 2004) e o pellet de espermatozoides é adicionado de um diluente à base de lactose e gema de ovo (diluente II) para a concentração de $1,5 \times 10^9$ espermatozoides/ mL e refrigerado à 5 °C por 2 horas (WESTENDOR et al., 1975). Ao atingir 5 °C, duas partes do sêmen pré-diluído é adicionado de uma parte de um diluente à base de 92,5 % de diluente II, 6% de glicerol e 1,5 % de Orvus ES Paste. O sêmen diluído é envasado em palhetas de 0,5 mL (ERIKSSON et al., 2001) e criopreservados em vapor de nitrogênio por 15 minutos (BAISHYA et al., 2014) ou em sistema automático respeitando a curva: - 6 °C/min de 5 a - 5 °C, - 39.82 °C/min de - 5 a - 80 °C, e - 60 °C/min de - 80 a -150 °C (CASAS et al., 2010).

Na última década, muitos trabalhos estudaram diversas técnicas para a melhoria da congelabilidade do sêmen suíno, entre elas: adição de diferentes períodos de HT aos protocolos (CASAS; ALTHOUSE, 2013; TOMÁS et al., 2014), retirada e/ou adição de plasma seminal (SARAVIA et al., 2009; TORRES et al., 2016a; TORRES et al., 2016b), adição de antioxidantes (YESTE et al., 2014), alteração de protocolos de criopreservação (HOLT et al., 2005, TORRES et al., 2016a; TORRES et al., 2016b) e uso de frações específicas do ejaculado (VILAGRAN et al., 2015). Entretanto, essas alternativas mostram pouca consistência e repetibilidade dos resultados. O que pode ser decorrência da diferença entre os ejaculados na habilidade em suportar os dados oriundos dos processos de refrigeração, congelação e descongelação a qual é denominada criotolerância (HOLT et al., 2005; PEÑA et al., 2006). Essa habilidade difere entre espécies, raças, animais e até mesmo ejaculados de um mesmo animal (HOLT et al., 2005; PEÑA et al., 2006) independente da sua qualidade pré-criopreservação (ROCA, 2006) ou do protocolo de criopreservação utilizado (HOLT et al., 2005). Deste modo, um dos maiores desafios da congelação do sêmen suíno, é prever o potencial de congelabilidade dos ejaculados antes de submetê-los ao processo de criopreservação (YESTE et al., 2013). Portanto, a identificação e seleção dos ejaculados com maior criotolerância é uma das principais metas para maximizar o uso do sêmen congelado de suíno (HERNÁNDEZ et al., 2006). Entretanto, é impossível realizar essa identificação através dos parâmetros convencionais de análises seminal (CASAS et al., 2009, 2010). O que tem levado as pesquisas acerca da criopreservação do sêmen a buscar marcadores moleculares de congelabilidade do ejaculado.

Dentre os protocolos de criopreservação de sêmen das espécies domésticas, o protocolo base de criopreservação do sêmen suíno difere pela presença do *holding time* (HT) à 17 °C pré-criopreservação. Com isso, durante a congelação do sêmen suíno há uma etapa a mais, que nas demais espécies domésticas, onde as diferenças de congelabilidade entre os ejaculados podem se manifestar. O HT é um período de refrigeração lenta (da temperatura

ambiente [25 °C] até 17 °C) pré-criopreservação no qual o sêmen fica ligeiramente diluído em meio de refrigeração e em contato com seu próprio plasma seminal. Esse período tem sido utilizado para melhorar a refrigeração à 5 °C (PURSEL, et al., 1973) e a criopreservação do sêmen suíno desde a década de 1970 (PURSEL; JOHNSON, 1975; WESTENDORF, 1975).

O HT tem sido descrito por aumentar a criotolerância dos espermatozoides suínos (ERIKSSON et al., 2001; GALE et al., 2014; TOMÁS et al., 2014; YESTE et al., 2014; WASILEWSKA; FRASER, 2017), melhorando a motilidade total e progressiva (ERIKSSON et al., 2001; YESTE et al., 2014; WASILEWSKA; FRASER, 2017), a integridade de membrana plasmática (ERIKSSON et al., 2001; YESTE et al., 2014; WASILEWSKA; FRASER, 2017), a integridade de acrossoma (WASILEWSKA; FRASER, 2017), a permeabilidade de membrana (YESTE et al., 2014; WASILEWSKA; FRASER, 2017), a desordem de membrana, os níveis intracelulares de cálcio e a fragmentação de DNA (YESTE et al., 2014). E apesar de alguns estudos indicarem alguns possíveis eventos ocorridos durante esse período (YESTE et al., 2014; VALENCIA et al., 2017) atualmente, quase meio século após o início da utilização do HT ainda não se sabe ao certo o que acontece durante esse período para gerar tamanho aumento na criotolerância dos espermatozoides suínos.

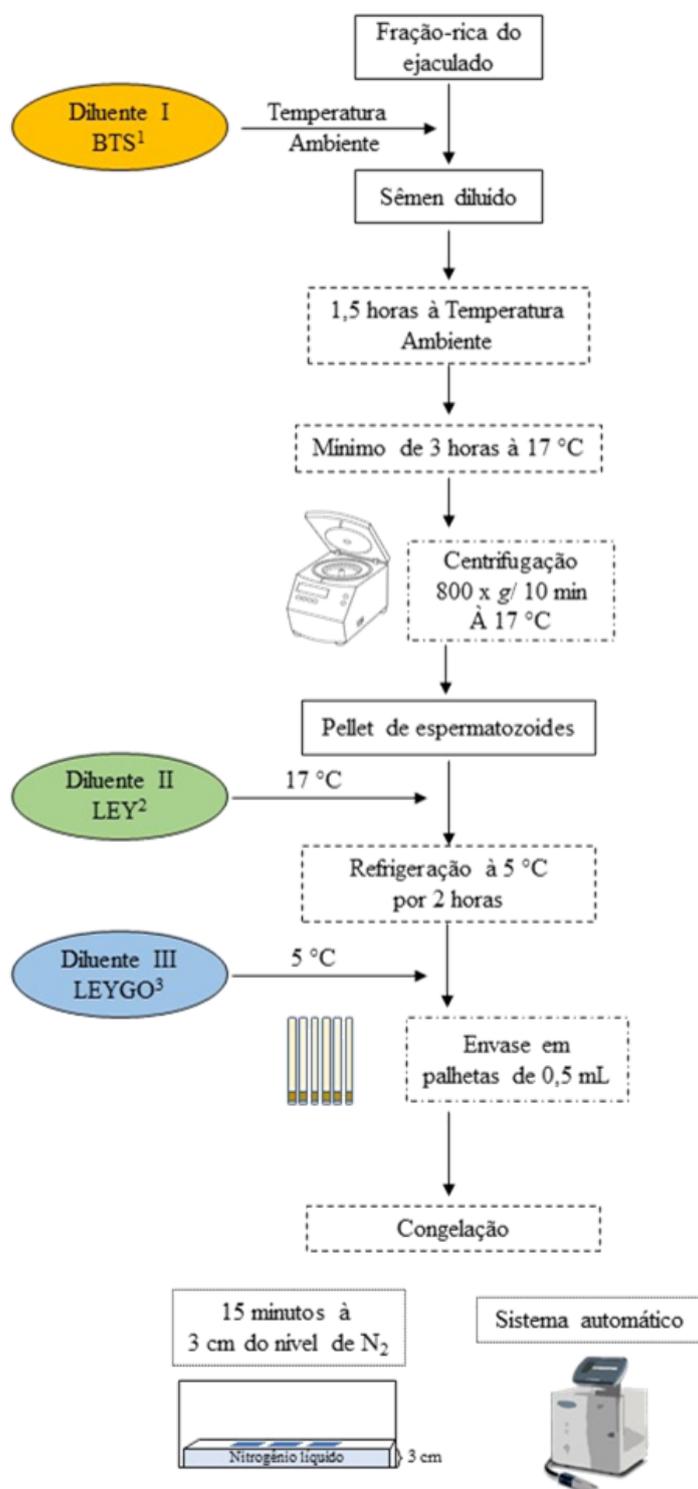
Uma vez que, os espermatozoides estão em contato com o plasma seminal (PS) durante o HT, não podemos esquecer que este fluído é uma mistura complexa resultante de diferentes secreções produzidas por diversas estruturas do trato reprodutivo masculino tais como: testículos, epidídimo e glândulas sexuais acessórias. Vários componentes orgânicos e inorgânicos constituem o PS como aminoácidos, proteínas, íons, frutose, sorbitol, inositol, bicarbonato, substâncias antimicrobianas, lipídios e uma gama variada de substâncias hormonais. E esses diversos componentes desempenham importante papel não somente sobre o metabolismo espermático, mas também no processo de fecundação (GARNER; HAFEZ, 2004). A composição química e a função das secreções oriundas das glândulas sexuais acessórias variam entre as espécies, entre machos da mesma espécie e entre ejaculados de um mesmo macho (AURICH et al., 1996).

Além disso as diferenças na concentração de alguns elementos seminais podem ser decorrentes da diferença metabólica dos espermatozoides suspensos nesse plasma seminal (JUYENA; STELLETTA, 2012). Deste modo, é possível que essas diferenças e outras diferenças apareçam durante o HT. Esse tempo, além de ser a etapa mais longa do processo de criopreservação é também o momento no qual os espermatozoides estão submetidos a uma temperatura (17 °C) que permite que o metabolismo espermático se mantenha ativo, apesar de reduzido. Portanto, a utilização da metabolômica como ferramenta para compreender as

diferenças no perfil dos espermatozoides e do plasma seminal parece ser a mais adequada. A metabolômica pode ser considerada o fenótipo bioquímico das células, uma vez que se uma via metabólica for identificada pela análise metabolômica sabe-se que os genes envolvidos foram expressos e por conseguinte as proteínas foram traduzidas (D'OOCHIO et al., 2019).

Esses fatos nos levam a crer que, possivelmente, não apenas o perfil *in natura* dos diferentes componentes dos espermatozoides e do plasma seminal seria responsável por influenciar a congelabilidade dos espermatozoides; mas também as mudanças geradas nesse perfil pelo HT possivelmente influenciam a alteração do potencial de criotolerância dos espermatozoides. Diante do exposto, o presente projeto visa elucidar a função dos metabólitos seminais na diferença de criotolerância entre ejaculados suínos, e procura compreender a ação do HT sobre o metabolismo celular e sua consequência no potencial de criotolerância dos espermatozoides suínos.

Figura 1: Esquema do protocolo longo de criopreservação atualmente utilizado e baseado no protocolo descrito por Westerndorf (1975).



Fonte: Adaptado de ALMLID et al., 1987

¹ Diluyente de refrigeração, sendo o mais utilizado BTS (Bestville Thawing Solution); ² Diluyente de refrigeração à 5 °C à base de lactose e gema de ovo (do inglês Lactose Egg Yolk - LEY); ³ Diluyente de criopreservação à base do diluyente LEY acrescido de 6% de glicerol.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA E O USO DO *HOLDING TIME* À 17 °C PRÉ-CRIOPRESERVAÇÃO

Apesar da criopreservação do sêmen ser uma biotécnica de difusão mundial (WATSON, 1996), a utilização do sêmen suíno criopreservado ainda é restrita (ERIKSSON et al., 2001). A possibilidade de congelação do sêmen suíno sem grandes prejuízos aos índices de produtividade das granjas possibilitaria uma série de vantagens em relação ao uso do sêmen refrigerado, tais como: facilitar a inserção de genética no rebanho, por possibilitar o transporte de material genético à nível internacional (ERIKSSON et al., 2001); preservar o material genético de raças de suínos em extinção; controlar a transmissão de doenças aumentando a biossegurança do rebanho (BAILEY et al., 2008).

O ejaculado suíno possui várias diferenças em relação às outras espécies domésticas, mas uma diferença em particular se torna muito importante quando o assunto é criopreservação: o volume do ejaculado. Um suíno púbere ejacula entre 200 a 500 mL, mas apenas a fração rica do ejaculado é utilizada para a criopreservação seminal, a média de volume dessa fração é de 30 a 50 mL (BARRANCO et al., 2015), ainda um grande volume comparado à outras espécies. Esse grande volume gera a necessidade de centrifugação do sêmen para concentrar os espermatozoides e permitir o envase em palhetas de 0,5 mL (CARVAJAL et al., 2004). Entretanto, sabe-se que o plasma seminal exerce várias funções nos espermatozoides suínos sendo fundamental para os processos de congelação e descongelação (TORRES et al., 2016a; TORRES et al., 2016b).

O HT é um período de refrigeração lenta pré-criopreservação no qual o sêmen fica ligeiramente diluído em meio de refrigeração e em contato com seu próprio plasma seminal. Esse período tem sido utilizado para melhorar a refrigeração à 5 °C (PURSEL, et al., 1973) e a criopreservação do sêmen suíno desde a década de 1970 (PURSEL; JOHNSON, 1975), mas até então era realizado à temperatura ambiente (~22 °C) por duas horas. A ideia de refrigerar o sêmen a 15-17 °C (por 3 horas) antes de submeter a temperaturas inferiores (e. g. 5 °C) as quais os espermatozoides suínos são mais sensíveis ao choque térmico, iniciou-se na Alemanha ainda na década de 70 por Westendorf (1975), mas a difusão dessa ideia foi lenta. Somente após mais de 10 anos essa técnica passou a ser mais utilizada (ALMLID et al., 1987; DE LEEUW et al., 1990).

Os primeiros testes com diferentes períodos de HT começaram a ser realizados no início dos anos 2000, quando longos períodos de manutenção à 15-17 °C passaram a ser mais cogitados; após ERIKSSON et al., (2001) descrever que períodos de 10 e 20 horas de HT aumentavam a integridade da membrana plasmática comparado à 3 horas. Em 2005, Guthrie e Welch foram os primeiros a testarem 24 horas de HT, mas não obtiveram melhoras significativas na descongelação dos espermatozoides suínos. Em relação a fluidez da membrana espermática, Casas e Althouse (2013) descreveram que a exposição dos espermatozoides por 24 horas à 17 °C é capaz de moderar a fluidez da membrana dos espermatozoides expostos a temperaturas de choque térmico (5 °C) e possivelmente contribui para melhores resultados na congelabilidade dos espermatozoides.

Independentemente dos experimentos testando diferentes períodos de HT a permanência dos espermatozoides suínos refrigerados por 24 horas em contato com o plasma seminal anteriormente a criopreservação, tornou-se o mais popular devido a maior praticidade de manipulação e transporte entre centrais de difusão genética e laboratórios de criopreservação (TOMÁS et al., 2014).

Atualmente, quase meio século após o início da utilização do HT ainda não se sabe ao certo qual o período ideal de manutenção à 15-17 °C, nem o que acontece durante esse período para gerar tamanho aumento na criotolerância dos espermatozoides suínos. O que se sabe a respeito dos efeitos do HT é que este período permite um maior contato com o plasma seminal e gera uma maior tolerância a baixas temperaturas (YESTE, 2015). As evidências moleculares que se têm até o momento são decorrentes de dois estudos. Yeste e colaboradores (2014) descreveram que durante o HT ocorre um aumento nos níveis de fosforilação dos resíduos de serina da proteína HSP70 (heat-shock protein 70 kDa) e esse aumento é correlacionado com o aumento da criotolerância dos espermatozoides suínos. Já Valencia e colaboradores (2017) descreveram que há diferenças na abundância das proteínas HSP90a (proteína do choque térmico alfa de 90 kDa), L-PGDS (prostaglandina D sintase do tipo lipocalina) e NPC2 (proteína da doença de Niemann-Pick tipo C2). Esses autores demonstraram que a HSP90a está aumentada no plasma seminal após 3 horas de HT, sendo que esse aumento é mais pronunciado em machos de baixa congelabilidade. Já a NPC2, está aumentada no plasma seminal de machos com alta congelabilidade independentemente do HT utilizado (VALENCIA et al., 2017). Esses autores ainda demonstraram que a L-PGDS possui menores abundâncias em espermatozoides de machos com baixa congelabilidade após 3 horas de manutenção à 17 °C.

2.2 A INFLUÊNCIA DO INDIVÍDUO NA CONGELABILIDADE DOS ESPERMATOZOIDES SUÍNOS

A criopreservação espermática induz as células à uma situação não-fisiológica, para a qual é necessária alta capacidade de adaptação celular as alterações térmicas e osmóticas que ocorrem durante a diluição, refrigeração e criopreservação (WATSON, 1996). Os espermatozoides suínos comparados ao de outras espécies domésticas são considerados mais sensíveis ao choque-frio, principalmente pelas características da membrana plasmática, que nessa espécie apresenta pouco conteúdo de colesterol e fosfolípídios saturados (DE LEEUW et al., 1990). Além da maior sensibilidade dos espermatozoides suínos ao choque frio; é clara a diferença na capacidade de adaptação às alterações oriundas do processo de criopreservação (congelabilidade/criotolerância) dos espermatozoides de diferentes cachaaos, entre ejaculados de um mesmo animal, e até mesmo entre frações de um mesmo ejaculado (HOLT et al., 2005; YESTE et al., 2013).

Um dos maiores problemas na criopreservação do sêmen suíno é a identificação dos ejaculados de alta e baixa criotolerância antes de iniciar o processamento do sêmen para a congelação, uma vez que, uma ótima qualidade espermática pré-criopreservação não necessariamente garante uma boa qualidade na descongelação dos espermatozoides (ROCA et al., 2006). Aparentemente, a congelabilidade dos espermatozoides suínos está mais relacionada as diferenças individuais dos que ao processo de criopreservação propriamente dito (MEDRANO et al., 2009). Entretanto, as particularidades que induzem à maior criotolerância de alguns ejaculados suínos ainda permanecem pouco estudadas (CASAS et al., 2010; YESTE, 2016).

Com isso nas últimas décadas vários esforços têm sido empregados no estudo potenciais marcadores biológicos de criotolerância no sêmen. Um marcador biológico é uma característica ou indicador que é capaz de representar um fenótipo funcional. Para tanto as abordagens “ômicas”, como a genômica, transcriptômica e proteômica têm sido utilizadas para descrever moléculas que sejam potenciais biomarcadores de criotolerância. Ainda no início dos anos 2000, Thurston et al., (2002) descreveram que as variações de congelabilidade observadas entre cachaaos poderiam ser determinadas geneticamente. Atualmente, alguns estudos têm por objetivo identificar marcadores biológicos capazes de prever o potencial de criotolerância dos cachaaos. Algumas proteínas presentes nos espermatozoides suínos foram identificadas como marcadores biológicos de congelabilidade como: HSP90AA1 (proteína de choque térmico 90-KDa alfa A1), ACRBP (proteína ligante à acrosina), TPI (triosefosfato isomerase), VDAC2

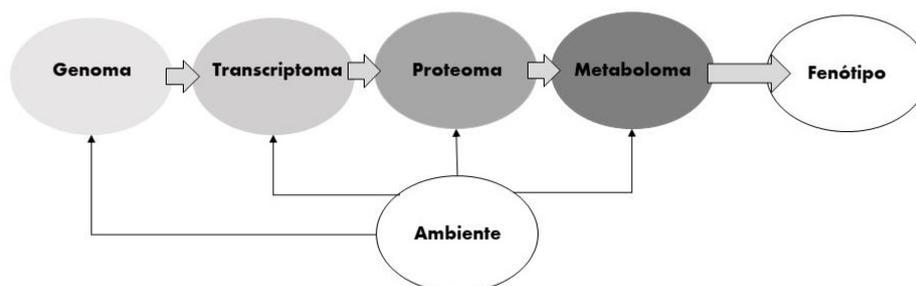
(proteína de canal iônico voltagem-dependente 2) (VILAGRAN et al., 2013, 2014); e também no plasma seminal como: fibronectina 1 (VILAGRAN et al., 2015).

Por outro lado, outra abordagem “ômica” vem se tornando mais pertinente, a metabolômica. Essa técnica tem sido descrita como o fenótipo bioquímico das células, fluídos, tecidos, órgãos ou mesmo organismo (D’OCCHIO et al., 2019). Nesse contexto, o estudo e identificação de potenciais biomarcadores associados ao estado fisiológico das células pode auxiliar a compreender as diferenças no potencial de criotolerância gerados durante as diferentes etapas da criopreservação; como possivelmente acontece durante o *holding time* à 17 °C anterior a criopreservação.

2.3 A METABOLÔMICA E A PROCURA DE MARCADORES NA ANDROLOGIA

A metabolômica é o estudo global do metaboloma que compreende uma gama de pequenas moléculas (<1500 Da), denominadas metabólitos, e seus componentes pertencem à diversas classes moleculares como carboidratos, lipídios, amino ácidos, ácidos orgânicos, ácidos nucleicos, vitaminas, poli fenóis, alcaloides e outras espécies inorgânicas (D’OCCHIO et al 2019). Os metabólitos são considerados os produtos finais ou intermediários de várias reações enzimáticas das células ou mesmo do organismo (PATTI et al., 2012; DIETRICH et al., 2019). A metabolômica é considerada a “ômica” mais próxima ao fenótipo (Figura 2); com isso, os metabólitos podem mais facilmente correlacionados com o fenótipo das células e/ou dos indivíduos; além do fato de não serem alterados por modificações funcionais como regulações epigenéticas, nos genes, e modificações pós-traducionais, nas proteínas (PATTI et al., 2012; D’OCCHIO et al 2019).

Figura 2 – Diagrama ilustrando o posicionamento do metaboloma dentro do diagrama de proximidade das “ômicas” com o fenótipo.



Fonte: Adaptado de D’OCCHIO et al 2019.

A metabolômica é uma ferramenta fundamental para a compreensão das alterações moleculares sua relação com as funções e ou disfunções celulares (LI et al., 2018). Os metabólitos presentes no plasma seminal desempenham várias funções nos espermatozoides como produção de energia, motilidade, proteção, controle do pH, regulação da atividade metabólica entre outras (BIENIEK et al., 2016). O uso de ferramentas metabolômicas para a procura de biomarcadores na andrologia humana e animal tem crescido nos últimos anos e se mostrado altamente eficiente. Os biomarcadores na andrologia humana e animal têm sido estudados nos espermatozoides (PATEL et al., 1998; JONES; BUBB, 2000; MARIN et al., 2003; HUNG et al., 2009; LIN et al., 2009; PAIVA et al., 2015; ZHAO et al., 2018; LAFFALDANO et al., 2018; REYNOLDS et al., 2018; MENEZES et al., 2019; FU et al., 2019; ENGEL et al., 2019), no plasma seminal (KUMAR et al., 2015; VELHO et al., 2018 ; WANG et al., 2019; ENGEL et al., 2019) e também no plasma sanguíneo (MA et al., 2019). Os estudos com humanos são os mais abrangentes e abundantes, abordando desde técnicas *non-target* (WANG et al., 2019; MA et al., 2019; ENGEL et al., 2019) até técnicas *target* para metabólitos e vias específicas (FU et al., 2019). Já os estudos metabolômicos voltados para a andrologia animal são mais restritos em relação as espécies estudadas e até mesmo as técnicas utilizadas.

Os touros são os machos domésticos com o metaboloma seminal mais estudado. Kumar et al. (2015) descreveu alguns biomarcadores presentes no plasma seminal capazes de diferenciar animais de alta e baixa fertilidade após a criopreservação seminal. Esses autores descreveram que o citrato e a isoleucina estavam em baixas concentrações em animais de alta fertilidade comparado com animais de baixa fertilidade, já a triptamina/taurina e a leucina tiveram comportamento oposto. Também em relação as associações entre os metabólitos do plasma seminal e a fertilidade de touros, Velho et al. (2018) descreveram que as proporções de abundância do ácido 2-oxoglutárico, ácido fosfórico, D-manitol e dulcitol foram maiores nos touros de baixa no que nos que alta fertilidade; já a frutose, 4-cetoglucose e o ácido eritrônico tiveram comportamento oposto. Segundo Menezes et al. (2019) os metabólitos: o ácido oleico, ácido fosfórico, fosfina, carbamato e glicerol são os mais abundantes nos espermatozoides de touros. Esses mesmos autores descrevem que é possível a discriminação de amostras de espermatozoides de touros de alta e baixa fertilidade a partir do seu metaboloma, e que os metabólitos que mais contribuíram para essa discriminação foram o GABA, carbamato, ácido benzoico e ácido láctico.

Recentemente, o metaboloma dos espermatozoides de outras espécies também tem sido estudado a fim de melhorar a reprodução de espécies como os perus (LAFFALDANO et al., 2018) e no caso do esturjão também para auxiliar na preservação da espécie (RAHUMI et

al., 2019). Já em macacos *rhesus*, o estudo do *fingerprint* metabolômico dos espermatozoides revelou que é possível a caracterização dos animais entre a estação do ano em que foi coletada as amostras, sendo que o acetato foi identificado como metabolito com maiores níveis no outono (LIN et al., 2009). Em relação à associação com o metabolismo energético as amostras tratadas com ACH (alfa-clorohidrina, um agente anti-fertilidade que afeta a motilidade espermática e o metabolismo intermediário; 3-cloro-1,2-propanediol) tiveram maiores níveis de acetilcarnitina e baixos níveis de ATP e carnitina (LIN et al., 2009).

Entretanto, os estudos de metabolômica não são tão recentes. No final da década de 90, Patel et al. (1998) investigaram os mecanismos envolvidos na ativação da atividade metabólica dos espermatozoides de caprinos pela ação da L-arginina com auxílio da técnica de metabolômica NMR (ressonância nuclear magnética). Esses autores concluíram que quantidade relativamente pequenas de L-arginina melhoram a síntese de adenosina trifosfato, melhorando com isso o metabolismo espermático.

O uso da metabolômica para o estudo da andrologia e função espermática em suínos ainda é muito escasso. Jones e Bubb (2000) investigaram os substratos endógenos para o metabolismo dos espermatozoides suínos por NMR e identificaram que a metabolização de alguns componentes endógenos pode atuar como substrato para a produção de ATP. Esses autores citam que os di- ou triglicerídeos podem ser utilizados para a produção de glicerol e os fosfolípidios de membrana como a acetilcarnitina e o glicerilfosfolípido para a produção de glicerol 3-fosfato. Já Marin et al. (2003) estudaram as características metabolômicas dos espermatozoides suínos e concluíram que o perfil metabólico dos espermatozoides suínos pode ser caracterizado por uma alta taxa glicolítica, mas com baixos níveis de glicose-6-fosfato.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar qual (ais) a (s) molécula (s) atua (m) na diferenciação dos cachacos com alto e baixo potencial de criotolerância; como ela (s) atua (m) para tal diferenciação, e se os processos metabólicos ocorridos nos espermatozoides durante o HT alteram o perfil metabolômico e o potencial de criotolerância dos espermatozoides suínos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar o período ideal de HT visando os melhores resultados pós-descongelção do sêmen suíno;
- 2) Verificar se há diferença entre animais de alta e baixa criotolerância em relação ao uso de HT;
- 3) Identificar os componentes seminais que atuam no aumento da criotolerância dos espermatozoides suínos, e qual o efeito do HT sobre o perfil metabolômico e criotolerância;

4 HIPÓTESES

1. A criotolerância dos espermatozoides suínos aumenta com o aumento do *holding time* pré-criopreservação até atingir sua eficiência máxima.
2. Há um tempo ideal de *holding time*, o qual gera o efeito máximo, além deste tempo há uma redução da criotolerância dos espermatozoides suínos.
3. O uso do *holding time* nos protocolos de criopreservação do sêmen suíno altera a congelabilidade do ejaculado.
4. A assinatura metabolômica da influência do uso de *holding time* no espermatozoide suíno conservado à 17 °C antes da criopreservação é capaz de explicar as diferenças observadas entre os grupos de congelabilidade.
5. A assinatura metabolômica da influência do uso de *holding time* no plasma seminal suíno da amostra conservada à 17 °C antes da criopreservação é capaz de explicar as diferenças observadas entre o uso ou não de HT no protocolo de congelamento.

5 ARTIGO I: O tempo ideal de manutenção à 17 °C para a qualidade espermática pós-criopreservação do sêmen suíno é de 24 horas

5.1 INTRODUÇÃO

A primeira criopreservação do sêmen suíno em pellets data de 1975 e foi realizada por Pursel e Johnson (1975). Já os atuais métodos de criopreservação (com palhetas de 5 e 0,5 mL; protocolo longo) tem sido utilizado por quase 40 anos (HOLFMO; GREVLE, 2000). Apesar do uso do sêmen criopreservado de suíno não ser recente, ele ainda não é utilizado em larga escala (YESTE, 2015). Mas, tal fato não se dá em somente devido danos à membrana plasmática e acrossomal e a redução da motilidade espermática (PURSEL; JOHNSON, 1975; YESTE, 2015; ROCA et al., 2016), mas também à complexidade dos processos longos de criopreservação atualmente utilizados (ROCA et al., 2016). Brevemente, esse protocolo consiste na coleta da fração rica do sêmen suíno (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 2011) seguida de diluição (1:1 até 1:5, diluente I - BTS) e manutenção em temperatura ambiente por 1,5 horas. Em seguida o sêmen é refrigerado à 15-18 °C por no mínimo 3 horas (*holding time* [HT], YESTE et al., 2014). Após o HT o sêmen diluído é centrifugado 800 g/ 10 min (ou 2400 g/ 3 min; CARVAJAL et al., 2004) e o pellet de espermatozoides é adicionado de um diluente à base de lactose e gema de ovo (diluente II) para a concentração de $1,5 \times 10^9$ espermatozoides/mL e refrigerado à 5 °C por 2 horas (WESTENDOR et al., 1975). Ao atingir 5 °C, duas partes do sêmen pré-diluído é adicionado de uma parte do diluente III (92,5 % de diluente II, 6% de glicerol e 1,5 % de Orvus ES Paste). O sêmen diluído é envasado em palhetas de 0,5 mL (ERIKSSON et al., 2001) e criopreservados em vapor de nitrogênio por 15 minutos (BAISHYA et al., 2014) ou em sistema automático à -0,1 °C/min (CASAS et al., 2010).

Por outro lado, os protocolos curtos de criopreservação (sêmen diluído diretamente em diluente de criopreservação - com crioprotetores- e criopreservado) são rotineiramente utilizados para a criopreservação de sêmen bovino, ovino e equino (ALMEIDA et al., 2017; DÍAZ et al., 2017; LANÇONI et al., 2018) e tem sido recentemente utilizado para criopreservar espermatozoides suínos (SILVA et al., 2015; QUIAN et al., 2016; TORRES et al., 2016a; TORRES et al., 2016b). Entretanto, esses estudos demonstram que os espermatozoides suínos parecem ser mais sensíveis à toxicidade da adição do glicerol a temperaturas mais elevadas comparado com espermatozoides bovinos, ovinos e equinos. Com isso, a incorporação de um período de manutenção à 17 °C anterior a criopreservação diminuiria a temperatura de adição

do diluidor com crioprotetor (de 37 para 17 °C) e possibilitaria a melhoria dos parâmetros pós-descongelamento do sêmen suíno.

Os laboratórios de criopreservação são normalmente distantes das centrais de difusão genética; com isso, o sêmen precisa ser coletado nas centrais e enviado ao laboratório para a criopreservação. Para isso, o ejaculado (ou a fração rica do ejaculado) é diluído em meio de refrigeração (por exemplo BTS), mantido à 15-17 °C (TOMÁS et al., 2014) e transportado em até 24 horas. Além de facilitar o processo de criopreservação, esse período também é descrito por aumentar a criotolerância dos espermatozoides suínos (ERIKSSON et al., 2001; CASA et al., 2013; GALE et al., 2014; TOMÁS et al., 2014; YESTE et al., 2014). Apesar de saber que o sêmen suíno precisa de pelo menos 3 horas à 17 °C antes da criopreservação (YESTE et al., 2014), e que usualmente é mantido por 24 horas à 17 °C por facilidade de manipulação e mão de obra, ainda não se sabe o período ideal de HT que garante os melhores resultados da qualidade espermática pós-descongelamento do sêmen suíno, nem se períodos maiores que 24 horas poderiam gerar melhores resultados.

Os componentes do plasma seminal participam em várias vias fisiológicas, como a ativação da motilidade espermática, antioxidação, estabilização da membrana plasmática e acrossomal, regularização do metabolismo mitocondrial, proteção contra inibidores de protease e contra o choque térmico (JUYENA; STELLETTA, 2012; YESTE et al., 2014). O aumento da criotolerância dos espermatozoides descrito pelo uso do HT pode ser devido à maior interação entre os componentes do plasma seminal com a membrana espermática durante esse período (METZ et al., 1990). Já se sabe que o uso que HT nos protocolos de criopreservação do sêmen suíno melhora os resultados pós-descongelamento. Entretanto, a literatura apresenta estudos apenas abordando protocolos longos de criopreservação e com testes restritos à poucos períodos de HT como 3, 10 e 20 horas (ERIKSSON et al., 2001); 0 e 24 horas (CASAS et al., 2013); 2 e 24 horas (GALE et al., 2014) 2, 8 e 24 horas (TOMÁS et al., 2014); 3 e 24 horas (YESTE et al., 2014). Com isso, o presente estudo foi delineado a fim encontrar o período ideal de HT e compreender como longos períodos atuariam sobre a qualidade espermática pós-descongelamento.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais realizados nesse trabalho foram aprovados (sob protocolo 5664140316) e estão de acordo com princípios éticos para experimentação

animal da “Comissão de Ética no Uso de Animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

5.2.1 Delineamento experimental

O delineamento experimento está apresentado na Figura 3. O experimento foi delineado em blocos casualizados, sendo cada cachaço considerado um bloco, e a unidade experimental foi considerada como 1/7 da fração-rica do ejaculado. Esse experimento foi delineado com o objetivo de estudar o efeito de sete diferentes tempos de manutenção (HT) à 17 °C anterior à criopreservação do sêmen suíno. As amostras foram obtidas de cinco cachaços, e cada uma delas foi dividida entre os sete tempos em três coletas individuais. Duas palhetas de cada cachaço/coleta/tempo de *holding* foram utilizadas para avaliar os parâmetros da cinética espermática, e outras duas palhetas foram utilizadas para as análises do estado fisiológico das membranas espermáticas incluindo a análise da integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, fluidez de membrana e susceptibilidade à peroxidação de membrana.

5.2.2 Reagentes

O diluidor de criopreservação Botu-Sui® (composto por açúcares, aminoácidos, tampões, 20% de gema de ovo [v/v], antibióticos, 2% de glicerol, 2 % de metilformamida [v/v]) foi desenvolvido e doado pela Biotech-Botucatu Ltda/ME (Botucatu, SP – Brasil). O meio de refrigeração BTS (Beltsville Thawing Solution) foi adquirido da IMV Technologies (L’Aigle, França). As sondas fluorescentes Syto 59 (S59), C11-BODIPY^{581/591} (BP), Yo-Pro-1 (YP), dihidroetídio (DHE), iodeto de 5,5',6,6' tetracloro 1,1',3,3' tetraetilbenzimidazolil carbocianina (JC) e a Merocianina-540 (M540) foram obtidas da Molecular Probe (Eugene, OR – EUA). Todos os outros compostos não mencionados a origem foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO – EUA).

5.2.3 Coleta e análise *in-natura* do sêmen suíno

Foram realizadas a coleta de três frações ricas do ejaculado de cada cachaço (n = 15) pelo do método da mão enluvada. Para tanto, foi realizada prévia higienização do prepúcio do macho. Imediatamente após a coleta, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente em

seu próprio plasma seminal (sem diluição) por 30 minutos (PURSEL et al., 1973; SARAVIA, 2008). O sêmen *in natura* foi avaliado quanto ao volume, concentração espermática (hemocítômetro), cinética espermática (análise computadorizada – SCA, Microptics®, Barcelona – Espanha) e morfologia (contraste de interferência diferencial). Após as análises *in natura* o sêmen foi diluído em BTS (1:2; v:v, 16,5 mL de sêmen: 33 mL de diluente), dividido em sete tubos de fundo cônico de 50 mL e refrigerado à 17 °C durante 0, 4, 8, 12, 24, 28 e 32 horas.

5.2.4 Criopreservação e descongelação do sêmen suíno

Após cada HT, uma alíquota foi centrifugada à 2400 x g/10 min (CARVAJAL et al., 2004), o pellet de espermatozoides foi separado do sobrenadante, e suspenso em diluente de criopreservação (BotuSui® Botupharma, Botucatu-SP) para a concentração de 600 x 10⁶ espermatozoides/mL (RAVAGNANI et al., 2018) envasadas em palhetas de 0,5 mL (IMV Technologies, Laigle, França) e submetido ao protocolo curto de criopreservação realizado em sistema automático (TK 4000®, TK Tecnologia em Congelação Ltda., Uberaba, Brasil) descrito por Torres et al (2016a; 2016b). Para a refrigeração, as palhetas foram colocadas no porta-palhetas, obedecendo uma curva de refrigeração de -0,5 °C/minuto até 5 °C, a curva de congelamento foi realizada a uma taxa de -20 °C/minuto de 5 °C até -120 °C. Após a curva de congelamento as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido (-196 °C). Por fim, as palhetas foram raqueadas e armazenadas em botijões criogênicos. Todas as palhetas foram mantidas a -196 °C por pelo menos duas semanas. Após esse período, duas palhetas de cada tratamento foram descongeladas em banho-Maria a 37 °C por 30 segundos e diluídas diretamente em BTS (1:1; v:v). Para as análises pós-descongelação o sêmen foi novamente diluído para atingir a concentração ideal para cada análise, como descrito à seguir.

5.2.5 Análises pós-descongelação

2.3.5.1 Análise da cinética espermática

As amostras foram diluídas em meio BTS para concentração de 50 x 10⁶ espermatozoides/mL. Uma alíquota de 5 µL foi disposta sobre câmara de Mackler e foram capturadas imagens sequenciais por uma câmera acoplada a um microscópio de contraste de fase (Nikon Eclipse Ni-U), as imagens foram avaliadas pelo software Sperm Class Analyzer (Microptics – Barcelona). O software foi configurado para realizar 21 frames/ segundo para a

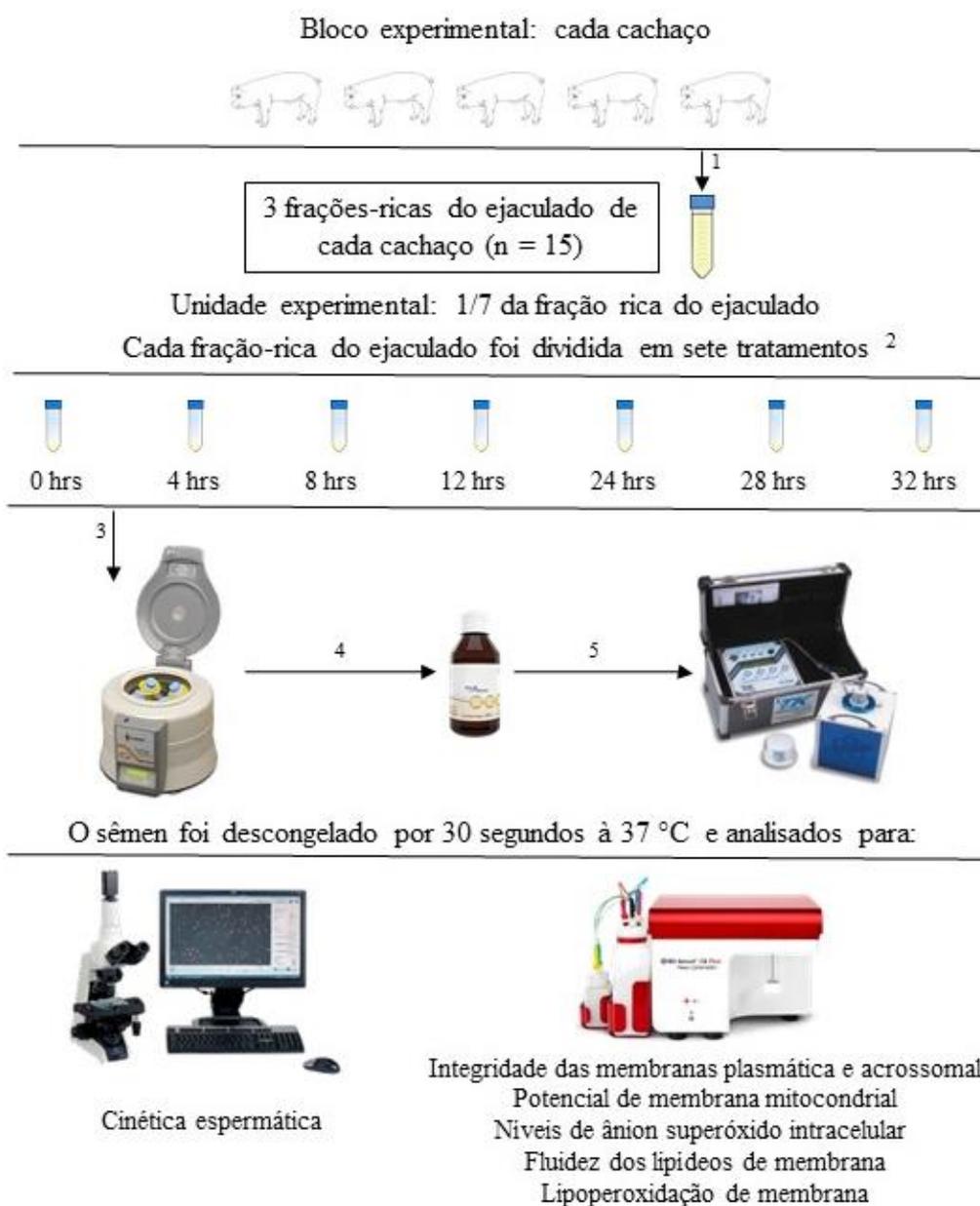
captura das imagens. Foram considerados espermatozoides as partículas com área maior que $12 \mu\text{m}^2$ e menor que $80 \mu\text{m}^2$. A motilidade total foi definida como a porcentagem de espermatozoides com $\text{VAP} > 15 \mu\text{m/s}$, e a motilidade progressiva foi definida como a porcentagem de células com $\text{STR} > 45\%$. Um total de cinco campos microscópicos, com pelo menos 150 espermatozoides foram avaliados quanto a motilidade total (MT), e progressiva (MP), velocidade de trajeto (VAP), velocidade linear (VSL) e velocidade curvilinear (VCL), linearidade (LIN), retilinearidade (STR), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) e pela frequência de batimento (BCF). Foram realizados ainda ajustes na ferramenta edit/sort do referido software para análise de hiperativação, sendo que os espermatozoides foram considerados hiperativos se $\text{ALH} \geq 3.5 \mu\text{m}$ e $\text{VCL} \geq 97 \mu\text{m/s}$ (SCHMIDT; KAMP, 2004).

2.3.5.2 Análise do estado fisiológico das membranas espermáticas

As amostras para a análise do estado fisiológico das membranas espermáticas foram marcadas, como descritas a seguir, e analisadas por citometria de fluxo BD AccuriC6 (Beckton-Dickeson, San Jose, USA). As amostras foram previamente diluídas em meio TALP para concentração de 5×10^6 espermatozoides/mL. Em todas as análises foram utilizadas a sonda Syto-59 (5 mM, S10341, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA), essa sonda é permeável à membrana plasmática e possui afinidade pelo DNA (DÍAZ et al., 2017). Com isso, as partículas não-espermáticas de tamanho e complexidade interna semelhantes aos espermatozoides foram excluídas das análises. As amostras tiveram uma taxa de aquisição de aproximadamente 600-1000 eventos/s, sendo analisadas 10000 eventos Syto-59 positivo por amostra. As células foram excitadas ao mesmo tempo por um laser de argônio na faixa de 488 nm e por um laser vermelho na faixa de 640 nm. A emissão de fluorescência das sondas excitadas pelo laser de argônio foi captada pelos canais FL1 (Band pass 533/30 nm), FL2 (Band pass 585/40 nm) e FL3 (Band pass > 670 nm), já a sonda fluorescente excitada pelo laser vermelho foi captada no canal FL4 (Band pass 675/25 nm).

A avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal, foi realizada por meio da seguinte associação das sondas fluorescentes: 1 μL de Syto 59 (5 mM, S10341), 1 μL de Iodeto de Propídio (IP-0,5mg/mL) e 1 μL de aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA-100 $\mu\text{g/mL}$). Após 10 minutos de incubação a 37°C , os espermatozoides foram diluídos com 150 μL de TALP e analisados por citometria de fluxo (DÍAZ et al., 2017).

Figura 3- Esquema ilustrativo do delineamento experimental para os diferentes tempos de HT.



¹ Depois da coleta o sêmen foi mantido por 30 minutos a temperatura ambiente e então diluído BTS (1:2, v: v); ² Os tratamentos foram considerados os tempos de *holding time* 17 °C anterior ao protocolo curto de criopreservação; ³ Centrifugação 2200 x g/ 3min; ⁴ Diluição com o Botu-Sui®- composto por açúcares, aminoácidos, tampões, 20% de gema de ovo (v/v), antibiótico, 2% glicerol como crioprotetor, e 2% metilformamida (v/v); ⁵ Protocolo curto de criopreservação;

Fonte: Torres (2019).

Para a análise da fluidez da membrana plasmática foi empregada a técnica de citometria de fluxo (FLESCH et al., 1999), que tem por objetivo avaliar a fluidez dos fosfolípidios por meio da sonda fluorescente M540 que possui afinidade pela porção lipídica dos fosfolípidios de membrana (porção hidrofóbica) marcando as células viáveis (Yo Pro1 negativas). Para tanto, as amostras foram incubadas com 1µL da sonda Yo Pro-1 (7,5 mM). Após 10 minutos de incubação foram adicionados 1µL de S59 e incubado por 10 minutos, e então foi adicionado 1 µL da sonda M540 (810 µM) e incubada por 70 segundos (DÍAZ et al., 2017). Por fim as amostras foram diluídas com 150 µL de TALP e analisadas em citometria de fluxo.

Para a avaliação do potencial de membrana mitocondrial foi adicionado à 150 µL de sêmen diluído 1 µL de S59 (5 mM, S10341), 1 µL de Iodeto de Propídio (IP-0,5mg/mL), 1 µL de JC-1 (153 µM, T-3168). Após 10 minutos de incubação a 37°C, os espermatozoides foram diluídos com 150 µL de TALP e analisados por citometria de fluxo (DÍAZ et al., 2017).

A análise da susceptibilidade à lipoperoxidação de membrana foi analisada indiretamente, por citometria de fluxo, por meio do potencial de peroxidação da sonda fluorescente C11-BODIPY^{581/591} apenas das células viáveis (IP negativo) como anteriormente descrito por Neild et al (2005). Para tanto, os espermatozoides foram incubados com 1 µL da sonda BP (1 mg/mL, D-3861) por 20 minutos a 37°C. Após esse período, foram adicionados 1µL de S59 e 1 µL de IP (DÍAZ et al., 2017). Após 10 minutos de incubação a 37°C, os espermatozoides foram diluídos com 150 µL de TALPm e analisados por citometria de fluxo.

O ânion superóxido intracitoplasmático foi mensurado com auxílio da sonda fluorescente DHE (Dihidroetidium), que ao ingressar no citoplasma celular reage com o ânion superóxido (O₂⁻) e forma o amarelo (567nm) 2 -hydroxyethidium (AITKEN et al., 2007) detectado por citometria de fluxo nas células viáveis (Yo-Pro1 negativas). Para tanto, as amostras foram incubadas com 1µL de DHE (100mM, D1168) por 10 minutos e então adicionada de 1 µL de Yo-Pro1. Após 10 minutos de incubação foi adicionado 1 µL de Syto-59 e incubado por mais 10 minutos, diluídas em 150 µL de TALP e analisadas por citometria de fluxo (DÍAZ et al., 2017).

5.2.6 Análise Estatística

Os tempos de manutenção à 17 °C (*HT*) foram considerados as variáveis fixas e os cachacos as variáveis aleatórias. A normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias foram verificadas e sempre que necessário os dados foram transformados por função

logarítmica ou arcoseno (para variáveis em porcentagem). Os efeitos de tratamento foram avaliados usando o PROC MIXED e as diferenças entre as médias foram avaliadas com o Tukey-Kramer (SAS[®] Studio, Copyright[©] 2012-2017, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Para todas as análises, foi considerado o nível de 5% de significância e os resultados estão apresentados em Média \pm EPM.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Cinética espermática

A criopreservação do sêmen suíno em protocolos curtos pode ter melhores ($p < 0,05$) resultados com a utilização de períodos de manutenção de 8 e 24 horas à 17 °C anterior a criopreservação, com relação à motilidade total e 24 horas de HT para a motilidade progressiva e a porcentagem de espermatozoides rápidos (Tabela 1). Todas as outras características avaliadas pelo CASA (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, ALH, BCF, HIPER) não foram afetadas ($p > 0,05$) pelos diferentes tempos de manutenção à 17 °C anterior ao protocolo curto de criopreservação do sêmen suíno.

5.3.2 Estado fisiológico das membranas espermáticas

A integridade das membranas plasmática e acrossomal e a fluidez da membrana plasmática foram avaliadas para verificar os efeitos do HT. Os espermatozoides criopreservados com HT a partir de 4 horas 17 °C foram mais resistentes ($p < 0,05$) aos danos nas membranas plasmática e acrossomal quando comparado aqueles criopreservados na ausência de HT (0 e 12 horas, Figura 4A), sendo que as amostras criopreservadas com 24 horas de HT apresentaram maior percentual de células com membrana plasmática e acrossomal íntegras do que aquelas criopreservadas após 12 horas de HT. Por outro lado, o uso de HT anterior ao protocolo curto de criopreservação do sêmen suíno não alterou ($p > 0,05$) os padrões de fluidez de membrana dos espermatozoides (Figura 4B).

O HT pode afetar o metabolismo espermático, o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) foi avaliado nas células com membrana plasmática íntegra. A criopreservação dos espermatozoides suínos a partir de 8 horas de incubação à 17 °C aumenta ($p < 0,05$) o $\Delta\psi_m$ (Figura 4C). O maior percentual de células viáveis com alto potencial mitocondrial ($p < 0,05$) foi observado após 32 horas à 17 °C comparado com 0 e 4 horas (Figura 4C).

Os efeitos do estresse oxidativo foram mensurados através dos níveis de ânion superóxido e da susceptibilidade à lipoperoxidação de membrana. O uso do HT gerou um aumento do ânion superóxido e da susceptibilidade à lipoperoxidação de membrana ($p < 0,05$). Os menores níveis de ânion superóxido foram observados nas amostras criopreservadas sem o uso de HT ($p < 0,05$) comparada com todos os tempos de incubação (Figura 5A). Já para a susceptibilidade à lipoperoxidação de membrana, as amostras criopreservadas com até 8 horas de HT tiveram baixos índices ($p < 0,05$) dessa susceptibilidade comparado com aquelas criopreservadas após 32 horas (Figura 5B).

Tabela 1 - Média (\pm EPM) das características de motilidade pós-descongelamento dos diferentes tempos de manutenção à 17 °C no protocolo de criopreservação do sêmen suíno

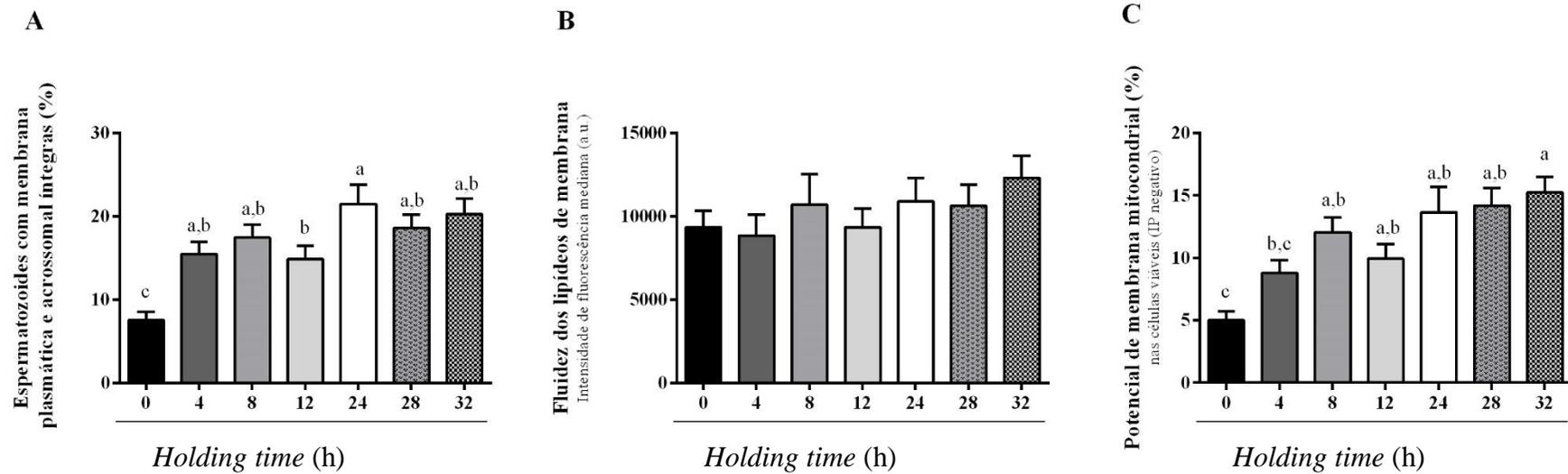
	Períodos de <i>holding time</i> (horas)						
	0	4	8	12	24	28	32
MT (%)	8,45 \pm 1,11 ^b	12,05 \pm 1,47 ^{a,b}	16,47 \pm 2,55 ^a	15,37 \pm 2,66 ^{a,b}	20,72 \pm 3,33 ^a	13,71 \pm 1,68 ^{a,b}	13,62 \pm 2,62 ^{a,b}
MP (%)	5,22 \pm 0,82 ^b	7,48 \pm 1,05 ^{a,b}	10,53 \pm 1,86 ^{a,b}	9,76 \pm 2,10 ^{a,b}	13,17 \pm 2,75 ^a	8,48 \pm 1,18 ^{a,b}	8,60 \pm 1,91 ^{a,b}
Rápidos (%)	4,42 \pm 0,75 ^b	5,89 \pm 1,05 ^{a,b}	8,79 \pm 1,72 ^{a,b}	8,71 \pm 2,03 ^{a,b}	11,18 \pm 2,50 ^a	6,94 \pm 1,15 ^{a,b}	6,36 \pm 1,46 ^{a,b}
VCL (μ m/s)	51,98 \pm 2,22	50,84 \pm 1,92	51,28 \pm 2,31	48,09 \pm 2,04	51,64 \pm 2,64	50,82 \pm 1,88	49,98 \pm 2,98
VSL (μ m/s)	24,36 \pm 2,33	24,85 \pm 2,14	24,94 \pm 2,25	22,41 \pm 2,56	25,50 \pm 2,68	26,14 \pm 2,17	25,26 \pm 2,70
VAP (μ m/s)	31,99 \pm 2,30	31,63 \pm 1,87	32,57 \pm 2,24	29,45 \pm 2,33	32,98 \pm 2,45	32,91 \pm 2,02	32,09 \pm 2,55
LIN (%)	46,00 \pm 2,91	46,96 \pm 2,93	47,44 \pm 3,11	45,50 \pm 3,75	48,53 \pm 3,43	51,00 \pm 3,03	50,80 \pm 3,47
STR (%)	74,66 \pm 2,09	74,96 \pm 2,03	74,52 \pm 2,51	73,50 \pm 2,92	75,47 \pm 2,70	78,44 \pm 1,77	77,68 \pm 2,39
ALH (μ m)	2,74 \pm 0,08	2,72 \pm 0,08	2,66 \pm 0,07	2,57 \pm 0,07	2,70 \pm 0,09	2,59 \pm 0,08	2,63 \pm 0,09
BCF (Hz)	5,86 \pm 0,20	5,72 \pm 0,26	5,73 \pm 0,25	5,42 \pm 0,27	5,80 \pm 0,33	6,00 \pm 0,24	5,93 \pm 0,24
Hiper (%)	1,17 \pm 0,13	1,57 \pm 0,25	1,72 \pm 0,21	1,43 \pm 0,19	1,40 \pm 0,25	1,19 \pm 0,20	1,30 \pm 0,35

Fonte: Torres (2019).

MT - Motilidade total; MP - motilidade progressiva; VAP - velocidade de trajeto; VSL - velocidade linear; VCL - velocidade curvelinear; LIN - linearidade; STR - retilinearidade; ALH - amplitude de deslocamento lateral da cabeça; BCF - frequência de batimento; Hiper - hiperatividade.

^{a-b} Letras minúsculas representam diferença estatística entre os períodos de manutenção à 17 °C ($P < 0,05$).

Figura 4- Média (\pm EPM) das características de membrana espermática pós-descongelamento dos diferentes tempos de manutenção à 17 °C no protocolo de criopreservação do sêmen suíno

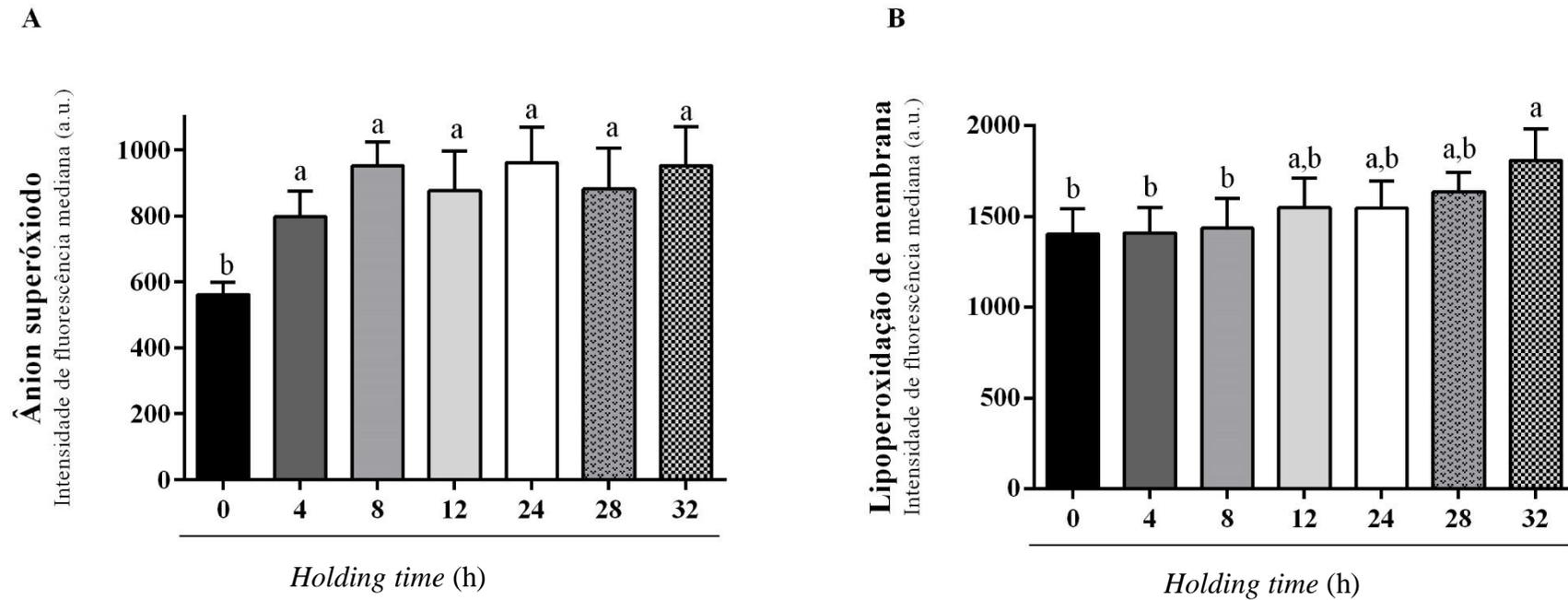


Fonte: Torres (2019).

(A) espermatozoides apresentando membrana plasmática e acrossomal íntegras simultaneamente; (B) fluidez dos lipídios de membrana mensurada pela intensidade de fluorescência mediana da sonda Merocianina 540; (C) espermatozoides com membrana plasmática íntegra e alto potencial de membrana mitocondrial.

^{a-c} Letras minúsculas representam diferença estatística entre os períodos de manutenção à 17 °C ($P < 0,05$).

Figura 5- Média (\pm EPM) das características do estado oxidativo das membranas espermáticas pós-descongelamento dos diferentes tempos de manutenção à 17 °C no protocolo de criopreservação do sêmen suíno



(A) intensidade relativa de ânion superóxido intracitoplasmático; (B) susceptibilidade à lipoperoxidação de membrana

^{a-c} Letras minúsculas representam diferença estatística entre os períodos de manutenção à 17 °C ($P < 0,05$).

5.4 DISCUSSÃO

O HT é amplamente utilizado para a criopreservação do sêmen suíno, para facilitar o processamento o sêmen é mantido à 17 °C por 24 horas. Entretanto, o período ideal que o sêmen deve ficar em contato com o seu próprio plasma seminal, sem efeitos deletérios, ainda é desconhecido. Na literatura é possível encontrar alguns trabalhos sobre o uso do HT, entretanto, como nenhum dele aborda longos períodos de manutenção à 17 °C, não é possível observar o aumento (no geral) da características pós-descongelção entre os tempos de manutenção até 24 horas, e em seguida uma queda de qualidade generalizada com o aumento dos tempo de HT.

O efeito do HT nas características da motilidade já foi previamente descrito por alguns autores, mas continua tendo resultados controversos. Wasilewska e Fraser (2017) descreveram que a manutenção do sêmen por 24 horas à 10 °C melhora a motilidade total e progressiva comparada com 2 horas à 17 °C. Entretanto, Yeste et al. (2014) descrevem que a motilidade total pós-descongelção não foi beneficiada pelo aumento do HT de 3 para 24 horas; enquanto para a motilidade progressiva os melhores resultados foram obtidos nas amostras criopreservadas após 24 horas de manutenção. Já Guthrie e Welch (2005) não demonstraram nenhuma melhora nas características de motilidade após 3 ou 24 horas de HT. Do mesmo modo, Tomás et al. (2014) constataram que a manutenção dos espermatozoides suínos por longos períodos (24 horas) não melhora a motilidade total e progressiva comparado a curtos períodos (2 ou 8 horas) de HT. Nossos resultados demonstram que 24 horas é o melhor período de manutenção para a motilidade total e progressiva, e com tempos de manutenção mais prolongados os resultados já passam a ser semelhantes a curtos períodos e até mesmo a ausência de HT.

Os espermatozoides ejaculados são capazes de absorver proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal (METZ et al., 1990; MOORE et al., 2005). Com isso, a incubação dos espermatozoides antes da criopreservação em seu próprio plasma seminal, ligeiramente diluído, pode permitir os espermatozoides incorporarem uma grande quantidade de proteínas do plasma seminal. Nesse contexto, a calcitonina presente no plasma seminal, por exemplo, pode incorporar-se nos espermatozoides suínos durante o HT. Essa proteína tem alta correlação positiva ($r = 0,8581$, $p < 0,05$) com a motilidade espermática (PIPAN et al., 2017). Portanto, tal fato poderia explicar nossos resultados, no qual foi observado melhora da motilidade total e progressiva com 24 horas de HT. Pipan et al. (2017) também descreveram uma correlação negativa entre a concentração seminal de cálcio ($r = -0.436$, $p < 0,05$) e a motilidade progressiva. A regulação da motilidade pelo cálcio é concentração-dependente, na qual baixas

concentrações estimulam a motilidade e altas concentrações inibem (BHOUMIK et al., 2014). Alguns prostassomos foram descritos por serem responsáveis por carregarem cálcio (PARK et al., 2011) e eles são capazes de se ligarem aos espermatozoides e transferirem seu conteúdo (BURDEN et al., 2006). Assim, a longa exposição aos prostassomos pode explicar o aumento intracelular de cálcio, o que pode explicar a queda da motilidade em longos períodos (28 e 32 horas) de HT.

O uso do HT na criopreservação dos espermatozoides suínos apresentou efeitos benéficos para as membranas plasmática e acrossomal, quando utilizado por 24 horas. Corroborando, Eriksson et al., (2001) demonstraram que curtos períodos de HT (3 horas) não tem o mesmo efeito benéfico que longos períodos (10 e 20 horas) para a integridade da membrana plasmática. De maneira similar, Yeste et al. (2014) reportaram que a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides suínos pós-descongelamento pode ser melhorada com o aumento do HT de 3 para 24 horas, mas sem alterar a integridade do acrossoma. Já, Wasilewska e Fraser (2017) demonstraram que o uso de 24 horas de HT à 10 °C melhorou a integridade da membrana plasmática da maioria dos animais avaliados comparado com 2 horas à 17 °C; mas os mesmos autores não demonstraram os mesmos efeitos no que diz respeito a integridade da membrana acrossomal.

Tais resultados podem ser explicados baseados no fato que as espermedesinas possuem a habilidade de se ligarem a membrana espermática depois da ejaculação, pela ação da colina de alguns fosfolípidios. As espermedesinas pertencem a superfamília das BSP (proteínas ligantes aos espermatozoides) a qual pode ser classificada pela habilidade de se ligar a heparina (HPB – proteínas ligantes a heparina que inclui AQN-1, AQN-3, AWN) ou não (PSP-I e PSP-II) (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011; PLANTE et al., 2016). A AQN-1 é relacionada com a integridade da membrana plasmática (CABALLERO et al., 2009) enquanto a AWN e a AQN-3 fazem parte da estabilização do acrossoma (DOSTÁLOVÁ et al., 1995). Além das espermedesinas às HSP também parecem exercer alguma função no aumento da integridade de membrana. Os espermatozoides suínos criopreservados após HT de 24 horas aumentam os níveis de fosforilação dos resíduos de serina da proteína HSP70 (proteína do choque térmico 70 kDa). As HSP são responsáveis por protegerem os espermatozoides contra os danos causados pelo choque térmico, resultando em melhora da integridade de membrana e aumento da criotolerância (YESTE et al., 2014). Portanto, é possível entender como 24 horas de HT aumentou a integridade das membranas plasmática e acrossomal no presente estudo. Entretanto, os efeitos das BSP é tempo e concentração dependente (MANJUNATH et al., 2002). Após longa exposição as proteínas BSP induzem efluxo de fosfolípidios e colesterol do folheto

externo da membrana plasmática consecutivamente aumenta a susceptibilidade ao choque-frio (THÉRIEN et al., 1998; THÉRIEN et al., 1999), tal fato pode explicar os efeitos deletérios dos longos períodos (28 e 32 horas) de HT para algumas características espermáticas.

Wasilewska e Fraser (2017) descreveram que o potencial de membrana mitocondrial pode ser melhorado com o uso de 24 horas de HT à 10 °C comparado com 2 horas à 17 °C. No presente estudo, foi observado resultado similar, no qual a porcentagem de espermatozoides vivos com alto potencial de membrana mitocondrial aumentou após 4 horas de HT. Tal melhora pode ser explicada pelo fato que durante o HT pode haver um balanceamento de algumas enzimas entre o plasma seminal e os espermatozoides. A glutatona (GSH) e a fosfatase alcalina (ALP) podem atuar disponibilizando a frutose como fonte de energia para a mitocôndria espermática. A fosfatase alcalina atua na síntese e disponibilidade da frutose para os espermatozoides (KING; MACPHERSON, 1966), enquanto a glutatona reduzida está envolvida na frutólise espermática (SLAWETA; LASKOWASKA, 1987). Possivelmente como consequência desse aumento do potencial mitocondrial, também foi observado um aumento na peroxidação lipídica (a partir de 12 horas de HT) e nos níveis de ânion superóxido (a partir de 4 horas de HT). Pipan et al. (2017) descrevem que os níveis seminais de ferro e selênio possuem correlação positiva com a integridade da membrana plasmática. Os espermatozoides refrigerados (durante o HT) estão sob condições oxidativas, uma vez que na temperatura de refrigeração o metabolismo ainda está ativo (KUMARESAN et al., 2009). Com isso, para manter o equilíbrio entre agentes antioxidantes e pró-oxidantes, evitando danos oxidativos, o ferro é consumido pelas enzimas Fe-dependentes (como a catalase), e o selênio é consumido para manter os níveis de glutatona peroxidase (CEROLINI et al., 2001). Portanto, a concentração desses íons possivelmente diminui durante a refrigeração e HT, causando a diminuição do potencial antioxidante. Apesar do aumento dos efeitos oxidativos em períodos prolongados de HT parecer claro, os resultados do presente estudo não corroboram com os apresentados por Yeste et al. (2014). Esses autores descrevem que os níveis intracelulares de peróxido não são alterados nos espermatozoides descongelados pelo uso de 3 ou 24 horas de HT. Por outro lado, os efeitos oxidativos observados no presente experimento não levaram a alteração da fluidez e integridade das membranas, o que nos leva a crer que o aumento dos níveis de ânion superóxido e na lipoperoxidação se mantiveram em níveis fisiológicos para as células espermáticas.

Durante e depois da ejaculação as HBP se ligam a superfície espermática e uma de suas funções é atuar com proteínas decapacitantes; protegendo os espermatozoides da capacitação prematura (PLANTE et al., 2016; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011). Outra molécula

associada com o potencial decapacitante espermático é o colesterol (CROSS, 1996), e metade do colesterol seminal está diretamente associado aos exossomos (CROSS; MAHASRESHTI, 1997). Piehl et al. (2013) demonstraram que os exossomos e lipossomos são capazes de bloquear a capacitação dependente de colesterol e diminuir a fluidez da membrana plasmática. Entretanto, a interação dos espermatozoides com o plasma seminal e seus possíveis exossomos, lipossomos e HPB durante o HT não alteraram a fluidez da membrana plasmática entre os diferentes tempos de HT. Por outro lado, Yeste et al. (2014; 3 e 24 horas), Wasilewska e Fraser (2017; 2 horas à 17 °C e 24 horas à 10 °C) demonstraram que curtos períodos de HT aumentam a fluidez de membrana comparado a 24 horas.

Com base nos resultados aqui discutidos é possível concluir que manter o sêmen suíno refrigerado à 17 °C por 24 horas anteriormente a criopreservação melhora a motilidade total e progressiva, a porcentagem de espermatozoides rápidos e a integridade das membranas plasmática e acrossomal. Já para atingir os maiores valores de potencial de membrana mitocondrial se faz necessário o uso de 32 horas de HT. Por outro lado, não foi possível controlar os níveis de ânion superóxido e a peroxidação lipídica, os quais não foram prejudiciais para outras características espermáticas. Assim, visando os melhores resultados para a criopreservação do sêmen suíno o período ideal de HT é de 24 horas à 17 °C.

REFERÊNCIAS

- AITKEN, R. J.; WINGATE, J. K.; DE IULIIS, G. N.; MCLAUGHLIN, E. A. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. **Molecular Human Reproduction**. v. 13, n. 4, p. 203–211, 2007.
- 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.
- ALMLID, T.; STAVNE, S. E.; JOHNSON, L. A. Fertility evaluation of the straw freezing technique for boar semen under practical AI conditions. **Zuchthygiene (Berl.)** v. 22, p. 193, 1987.
- AURICH, J. E.; KÜHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**. v. 46, n. 5, p. 791–797, 1996.
- BAILEY, J. L.; LESSARD, C.; JACQUES, J.; BRÈQUE, C.; DOBRINSKI, I.; ZENG, W.; GALANTINOHOMER, H. L. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. **Theriogenology**. v. 70, n. 8, p. 1251–1259, 2008.
- BARRANCO, I.; RUBÉR, M.; PEREZ-PATIÑO, C.; ATIKUZZAMAN, M.; MARTINEZ, E. A.; ROCA, J.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. The seminal plasma of the boar is rich in cytokines, with significant individual and intra-ejaculate variation. **American Journal of Reproductive Immunology**. n. September, p. 1-10, 2015.
- BHOUMIK, A.; SAHA, S.; MAJUMDER, G. C.; DUNGDUNG, S. R. Optimum calcium concentration: a crucial factor in regulating sperm motility in vitro. **Cell Biochemistry and Biophysics**. v. 70, p. 1177–1183, 2014
- BURDEN, H. P. HOLMES, C. H.; PERSAD, R.; WHITTINGTON, K. Prostatosomes- their effects on human male reproduction and fertility. **Human Reproduction Update**. v. 12, p. 283–292, 2006.

- CABALLERO, I.; VAZQUEZ, J. M.; MAYOR, G. M.; ALMIÑANA, C.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; ROCA, J.; MARTINEZ, E. A. PSP-I/PSP-II spermadhesin exert a decapacitation effect on highly extended boar spermatozoa. **International Journal of Andrology**. v. 32, p. 505–513, 2009.
- CARVAJAL, G.; CUELLO, C.; RUIZ, M.; VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A.; ROCA, J. Effect of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. **Journal of Andrology**. v. 25, p. 389–396, 2004.
- 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. 930–948, 2009.
- CASAS, I.; SANCHO, S.; BALLESTER, J.; BRIZ, M.; PINART, E.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; FÀBREGA, A.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; BONET, S. The HSP90AA1 sperm content and the prediction of the boar ejaculate freezability. **Theriogenology**. v. 74, n. 6, p. 940-950, 2010.
- 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, P. 69–75, 2013.
- CEROLINI, S.; MALDIJAN, A.; PIZZI, F.; GLIOZZI, T.M. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Reproduction**. v. 121, p. 395–401, 2001.
- CROSS, N. L. Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesterone: cholesterol is the major inhibitor. **Biology of Reproduction**. v. 54, p. 138–145, 1996.
- CROSS, N. L.; MAHASRESHTI, P. Prostasome fraction of human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist progesterone. **Archives of Andrology**. v. 39, p. 39–44, 1997.
- DÍAZ, R.; TORRES, M. A.; PAZ, E.; QUIÑONES, J.; BRAVO, S.; FARÍAS, J. G.; SEPÚLVEDA, N. Dietary inclusion of fish oil changes the semen lipid composition but does not improve the post-thaw semen quality of ram spermatozoal. **Animal Reproduction Science**. v. 183, p. 132–142, 2017.

DOSTÁLOVÁ, Z.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; TÖPFER-PETERSEN, E. Boar spermadhesin AWN-1. Oligosaccharide and zona pellucida binding characteristics. **European Journal of Biochemistry**. v. 230, p. 329–336, 1995.

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

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

GALE, I.; GIL, L.; MALO, C.; GONZÁLEZ, N.; MARTÍNEZ, F. Effect of Camellia sinensis supplementation and increasing holding time on quality of cryopreserved boar semen. **Andrologia**. v. 47, p. 505–512, 2014.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozoide e plasma seminal. In: HAFEZ E. S. E. **Reprodução Animal**. 7. Barueri: Manole Ltda, 2004. pp. 97–110, Cap.7.

GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. **Theriogenology**. v. 63, p. 396–410, 2005.

HERNÁNDEZ, M.; ROCA, J.; BALLESTER, J.; VÁZQUEZ, J. M.; MARTÍNEZ, E. A.; JOHANNISSON, A.; SARA VIA, F.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Differences in SCSA outcome among boars with different sperm freezability. **International Journal of Andrology**. v. 29, n. 6, p. 583–591, 2006.

HOFMO, P. O.; GREVLE, I. S. Development and commercial use of frozen use of frozen boar semen in Norway. In: JOHNSON, L.A.; GUTHRIE, H.D. **Boar Semen Preservation IV**. 1. Lawrence, KS: Allen Press, 2000, pp. 71–86.

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, p. 370–382, 2005.

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

JUYENA, N. S.; STELLETTA, C. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. **Journal of Andrology**. v. 33, p. 536–551, 2012.

KING, G. J.; MACPHERSON, J. W. Alkaline and acid phosphatase activity, pH and osmotic pressure of boar semen, **Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**. v. 30, p. 304–307, 1966.

KUMARESAN, A.; KADIRVEL, G.; BUJARBARUAH, K. M.; BARDOLOI, R. K.; DAS, A.; KUMAR, S.; NASKAR, S. Preservation of boar semen at 18 °C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. **Animal Reproduction Science**. v. 110, p.162–171, 2009.

LANÇONI, R.; CELEGHINI, E. C. C.; ALVES, M. B. R.; LEMES, K. M.; GONELLA-DIAZA, A. M.; OLIVEIRA, L. Z.; ARRUDA, R. P. Melatonin added to cryopreservation extenders improves the mitochondrial membrane potential of postthawed equine sperm. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 69, p. 78–83, 2018.

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.

MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MENARD, M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biology of Reproduction**. v. 67, p. 1250–1258, 2002.

METZ, K.W.; BERGER, T.; CLEGG, E. D. Adsorption of seminal plasma proteins by boar spermatozoa. **Theriogenology**. v. 34, p. 691–700, 1990.

MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. **Theriogenology**. v. 63, p. 2372–2381, 2005.

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

PIEHL, L. L.; FISCHMAN, M. L.; HELLMAN, U.; CISALE, H.; MIRANDA, P. V. Boar seminal plasma exosomes: effect on sperm function and protein identification by sequencing. **Theriogenology**. v. 79, p. 1071–1082, 2013.

PIPAN, M. Z.; MRKUN, J.; STRAJN, B. J.; VRTAČ, K. P.; KOS, J.; PIŠLAR, A.; ZRIMŠEK, P. The influence of macro- and microelements in seminal plasma on diluted boar sperm quality. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v. 59, p. 1–11, 2017.

PLANTE, G.; PRUD'HOMME, B.; FAN, J.; M. LAFLEUR, P. MANJUNATH, Evolution and function of mammalian binder of sperm proteins. **Cell and Tissue Research**. v. 363, p. 105–127, 2016.

PURSEL, V. G.; SCHULMAN, L.; JOHNSON, L. A. Effect of holding time on storage of boar spermatozoa at 5° C. **Journal Animal Science**. v. 37, p. 785–789, 1973.

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

QIAN, L.; YU, S.; ZHOU, Y. Protective effect of hyaluronic acid on cryopreserved boar sperm. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.87, p. 287–289, 2016.

ROCA, J.; HERNÁNDEZ, M.; CARVAJAL, G.; VÁZQUEZ, J. M.; MARTÍNEZ, E. A. Factors influencing boar sperm cryosurvival. **Journal of Animal Science**. v. 84, p. 2692–2699, 2006.

ROCA, J.; PARRILLA, I.; BOLARIN, A.; MARTINEZ, E. A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Will AI in pigs become more efficient? **Theriogenology**. v. 88, p. 187–193, 2016.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; KVIST, U.; ERNERUDH, J.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. Seminal plasma proteins: what role do they play? **American Journal of Reproductive Immunology**. v. 66, p. 11–22, 2011.

SARAVIA, F. **Cryopreservation of boar semen: impact of the use of specific ejaculate portions, concentrated packaging, and simplified freezing procedures on sperm cryosurvival and potential fertilizing**. 63f. Doctoral thesis - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2008.

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.

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

SILVA, C. G.; CUNHA, E. R.; BLUME, G. R.; MALAQUIAS, J. V.; BÁO, S. N.; MARTINS, C. F. Cryopreservation of boar sperm comparing different cryoprotectants associated in media based on powdered coconut water, lactose and trehalose. **Cryobiology**. v. 70, p. 90–94, 2005.

SLAWETA, R.; LASKOWASKA, T. The effect of glutathione on the motility and fertility of frozen bull semen. **Animal Reproduction Science**. v.13, p. 249–253, 1987.

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**. v. 59, p. 768–776, 1998.

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**. v. 61, p. 590–598, 1999.

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, p. 115–121, 2014.

TORRES, M. A.; DÍAZ, R.; BOGUEN, R. MARTINS, S. M. M. K.; RAVAGNANI, G. M.; LEAL, D. F.; OLIVEIRA, M. L.; MURO, B. B. D.; PARRA, B. M.; MEIRELLES, F. V.; PAPA, F. O.; DELL'AQUA JR., J. A.; ALVARENGA, M. A.; MORETTI, A. S.; SEPÚLVEDA, N.; ANDRADE, A. F. C. Novel flow cytometry analyses of boar sperm viability: can the addition of whole sperm-rich fraction seminal plasma to frozen-thawed boar sperm affect it? **PLoS One**. v. 1, p. e0160988, 2016a.

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

VILAGRAN, I.; YESTE, M.; SANCHO, S.; CASTILLO, J.; OLIVA, 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. 345–356, 2015.

WASILEWSKA, K.; FRASER, L. Boar variability in sperm cryo-tolerance after cooling of semen in different long-term extenders at various temperatures. **Animal Reproduction Science**. v. 185, p. 161–173, 2017.

WATERHOUSE, K. E.; HOFMO, P. O.; TVERDAL, A.; MILLER JR., R. R. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. **Reproduction**. v. 131, p. 887–894, 2006.

WATSON, P. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 31, n. 1, p. 135–140, 1996.

WESTENDORF, P.; RICHTER, L.; TREU, H. Zur Tiefgefrierung von ebersperma labor-und besamungsergebnisse mit dem hulsenberger pailletten-verfahren. **Dtsch. Tierartzl. Wschrr.** v. 82, p. 61–267, 1975.

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, n. 6, p. 929–939, 2013.

YESTE, M.; ESTRADA, E.; RIVERA DEL ÁLAMO, M. M.; BONET, S. T.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. The increase in phosphorylation levels of serine residues of protein HSP70 during holding time at 17°C is concomitant with a higher cryotolerance of boar spermatozoa. **PLoS One**. v. 9, p. 1–19, 2014.

YESTE, M. Recent Advances in boar sperm cryopreservation: state of the art and current perspectives. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 50, n. 2, p. 71–79, 2015.

6 ARTIGO II: O potencial de congelabilidade do ejaculado suíno e sua relação com o uso do *holding time* à 17 °C anterior à criopreservação: Uma visão metabólica

6.1 INTRODUÇÃO

A habilidade em resistir os processos de refrigeração, criopreservação e descongelamento, é denominada criotolerância, e difere entre animais e até mesmo entre ejaculados de um mesmo animal (HOLT et al., 2005; PEÑA et al., 2006). Nesse contexto, os ejaculados podem ser classificados em ‘ejaculados de alta congelabilidade’ (EAC) ou ‘ejaculados de baixa congelabilidade’ (EBC; adaptado da classificação em inglês feita por CASAS et al., 2009). Entretanto, o que difere entre os ejaculados são os resultados pós-descongelamento; ambas as categorias possuem ótima qualidade do sêmen *in natura* (ROCA et al., 2006).

O processo de criopreservação do sêmen suíno inclui três etapas de diluição seguidas de queda de temperatura (ALMLID; JOHNSON, 1988), ou seja, ao menos três possíveis pontos para que as diferenças de criotolerância se manifestem. A primeira etapa é o denominado *holding time* (HT), que é uma etapa exclusiva do protocolo de criopreservação do sêmen suíno, e é caracterizada por ser uma refrigeração lenta, da temperatura ambiente à 17 °C, por até 24 horas, na qual os espermatozoides permanecem ligeiramente diluídos, portanto, o contato com o plasma seminal continua sendo um fator de extrema importância (YESTE et al., 2014; TORRES et al 2019). Além de ser a etapa mais longa do processo, é a etapa na qual a temperatura de refrigeração permite que o metabolismo espermático se mantenha ativo, apesar de reduzido.

A complexidade molecular dos eventos que envolvem a alteração do potencial de criotolerância dos espermatozoides durante o HT ainda não é completamente compreendida. Entretanto, algumas evidências moleculares vêm sendo levantadas; como o aumento dos níveis de fosforilação dos resíduos de serina das proteínas HSP70, TRK (A, B e C), CDK1/CDC2 e GSK-3^a após 24 horas de HT (YESTE et al., 2014). Também existem relatos de que existe uma relação entre o aumento da criotolerância conferido durante o HT e a diferença no potencial de criotolerância dos ejaculados; sendo essa relação dependente das proteínas HSP90a, NPC2 (19 KDa) e a L-PGDS que diferem em concentração entre os períodos de HT utilizado (0 e 3 horas) e da criotolerância da amostra (VALENCIA et al., 2017).

Os metabólitos são originários dos eventos fisio- e patológicos, através de reações bioquímicas (PATTI et al., 2012; DIPRESA et al., 2018; D’OCCHIO et al 2019), e com isso o

metaboloma pode ser considerado o fenótipo bioquímico da célula e/ou do indivíduo (PATTI et al., 2012; GUIJAS et al., 2018; D'OCCHIO et al. 2019). A metabolômica é uma técnica que vem sendo amplamente utilizada para a procura de biomarcadores na reprodução. Mais especificamente na andrologia, os metabólitos seminais vêm sendo estudados nos espermatozoides de humanos (PAIVA et al., 2015; REYNOLDS et al., 2017; ZHAO et al., 2018; ENGEL et al., 2019; FU et al., 2019), bovinos (MENEZES et al., 2019, HOLDEN et al., 2017), esturjão (RAHIMI et al., 2019), perus (LAFFALDANO et al., 2018), cachacos (JONES; BUBB, 2000; MARIN et al., 2003) e bodes (PATEL et al., 1998); e no plasma seminal de humanos (ZHANG et al., 2015; ENGEL et al., 2018; WANG et al. 2019) e bovinos (KUMAR et al., 2015; VELHO et al., 2018). As investigações das alterações moleculares à nível dos espermatozoides e plasma seminal com a comparação do perfil ou mesmo a quantificação relativa dos metabólitos pode revelar algumas funções e/ou disfunções celulares durante a criopreservação (NICHOLSON et al., 1999; LIN et al., 2009).

Sabe-se que o HT melhora a criotolerância dos espermatozoides suínos, mas não se sabe ao certo se os EAC possuem esse potencial independente do HT ou se é algum processo intrínseco a esse *holding time* à 17 °C que garante esse aumento de criotolerância. Com isso, nesse experimento utilizamos a ferramenta metabolômica para auxiliar na compreensão dos eventos moleculares envolvidos durante o HT e sua relação com a criotolerância espermática.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais realizados nesse trabalho foram aprovados (sob protocolo 5664140316) e estão de acordo com princípios éticos para experimentação animal da “Comissão de Ética no Uso de Animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

6.2.1 Delineamento experimental

O experimento foi delineado em blocos casualizados, sendo cada cachaco considerado um bloco, e a unidade experimental foi considerada como 1/2 da fração-rica do ejaculado. A priori foram utilizados 27 machos suínos para coleta e criopreservação do ejaculado, os quais foram utilizados para formar dois grupos homogêneos de congelabilidade, a saber: ejaculados de alta congelabilidade (EAC) e ejaculados de baixa congelabilidade (EBC). Foi realizada uma única coleta da fração rica do ejaculado de cada um dos cachacos, e cada amostra foi dividida

em dois tratamentos: 0 h (sem refrigeração à 17 °C anterior a criopreservação) e 24 h (refrigerado por 24 horas à 17 °C anterior a criopreservação), em cada um dos tempos foi coletada amostras de espermatozoides e plasma seminal e congeladas até o momento das análises de metabolômica; em seguida as amostras foram criopreservadas e posteriormente a qualidade do sêmen descongelado foi avaliada por CASA e citometria de fluxo. As análises metabolômicas dos espermatozoides e do plasma seminal foram realizadas a fim de compreender o processo de aumento da criotolerância durante o HT e correlacionar este com a congelabilidade dos ejaculados.

6.2.2 Reagentes

O diluente de refrigeração BTS (Beltsville Thawing Solution) foi adquirido da IMV Technologies (L'Aigle, França) Os diluentes de congelação Botu-Sui® (Fração A [FA] – açúcares, amino ácidos, buffers, 20 % de gema de ovo [v/v] e antibióticos; Fração B [FB] – FA adicionada de 6% de glicerol e 6% de metilformamida [v/v] como crioprotetores) foi desenvolvido e doado pela Biotech-Botucatu- Ltda /ME (Botucatu, SP, Brasil). O metanol e a água ultra-pura foram adquiridos da Fluka Analytical (Buchs, Suíça). As sondas fluorescentes Syto59 (S59), C11-BODIPY^{581/591} (BP), Yo-Pro-1 (YP), JC-1 (iodeto de 5,5',6,6' tetracoloro 1,1',3,3' tetraetilbenzimidazolil carbocianina) e Merocianina 540 (M540) foram provenientes da empresa Molecular Probes (Eugene, OR, EUA). Quando não mencionada a origem os reagentes químicos utilizados foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

6.2.3 Animais e local

Para a realização desse experimento, foram utilizados vinte e sete cachacos (entre 9 e 30 meses) puros das raças Landrace (n = 15) e Large-White (n = 12), adultos e saudáveis, púberes, com histórico de qualidade e fertilidade de sêmen refrigerado normais. Todos os animais utilizados estavam instalados em baias individuais na Central de Difusão Genética pertencente à DB genética Suína e localizada em Presidente Olegário, MG (-18° 31' 77'', -46° 02' 39''). Os galpões eram climatizados por pressão negativa e a temperatura interior se mantinha entre 22-25 °C. Os animais eram alimentados de acordo com os protocolos padrões da empresa e a água era fornecida *ad-libitum*. Todos os animais foram submetidos ao regime de coleta da central, duas vezes por semana, pela técnica da mão duplamente enluvada e com

esgotamento do conteúdo do divertículo prepucial anteriormente a coleta; apenas um ejaculado por animal foi utilizado no experimento.

6.2.4 Avaliação seminal à campo

A fim de garantir a qualidade do sêmen *in natura*, após *holding time* à 17 °C e imediatamente após a descongelação foram realizadas análises seminais à campo. O sêmen *in natura* foi avaliado quanto ao volume, concentração espermática (câmara de Neubauer) e uma alíquota foi armazenada para posterior análise morfológica (contraste de interferência diferencial – DIC). A motilidade total e progressiva foi realizada da mesma maneira que na rotina da central (*in natura* e pós-refrigeração à 17 °C). Uma alíquota (3µL) de sêmen foi depositado em uma das câmaras da lâmina de avaliação Leja® e avaliado em sistema computadorizado AndroVision® (Minitube, Tiefenbach, Alemanha).

A integridade de membrana das amostras *in natura* e pós-refrigeração à 17 °C foram avaliadas pela técnica de Eosina-Nigrosina (BARTH; OKO, 1989). Para tanto, uma alíquota (5 µL) de amostra foi corada com 5 µL do corante eosina-nigrosina por 30 segundos e em seguida realizado o esfregaço em lâmina de microscopia. As células foram contadas em duplo-cego em um total de 200, em microscópio ótico comum (aumento 1000x).

Para a análise da integridade acrossomal das amostras *in natura* e pós-refrigeração à 17 °C foi utilizada a técnica descrita por POPE et al. (1991). Uma alíquota (6 µL) foi incubado com o corante rosa-bengala por 3 minutos e então realizado o esfregaço sobre lâmina de microscopia. Foram contadas 200 células em duplo cego sob microscopia ótica comum (aumento 1000x) e classificadas como acrossoma íntegro ou lesionado.

6.2.5 Criopreservação e descongelação seminal

Durante as análises do ejaculado *in natura* o sêmen permaneceu em temperatura ambiente (20 a 22 °C) em contato com o próprio plasma seminal por até 30 minutos (SARAIVA, 2008, TORRES et al., 2019). Depois o sêmen foi diluído em BTS (1:1, v:v) e dividido em duas alíquotas, à saber: 0h (sem refrigeração à 17 °C anterior a criopreservação) e 24h (refrigerado por 24 horas à 17 °C anterior a criopreservação, TORRES et al., 2019).

Após 0 ou 24 horas de refrigeração à 17 °C o sêmen foi centrifugado (2260 x g/ 3min; CARVAJAL et al., 2004) e o pellet de espermatozoides foi diluído na fração A do diluente de congelação BotuSui® (sem adição de crioprotetor penetrante) para concentração de $1,5 \times 10^9$

espermatozoides/ mL e refrigerado à 5 °C durante 120 minutos. Após atingir 5 °C, foi gentilmente adicionada a fração B do diluente de criopreservação (com 2% glicerol e 2% metilformamida, v:v) até a concentração de 1×10^9 espermatozoides/ mL. O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,5 mL e seladas com álcool polivinílico. Todo processamento foi realizado à 5 °C, e todos os equipamentos (palhetas, álcool polivinílico, papel toalha, raque de congelação) foram mantidos à 5 °C anteriormente ao processamento. A congelação foi realizada em vapor de nitrogênio, para isso, as palhetas foram posicionadas horizontalmente na raque de congelação de mantidas à 3 cm acima do nível do nitrogênio líquido, em caixa de isopor por 15 minutos. Passado o tempo de congelação, as palhetas foram submersas em nitrogênio líquido, e então mantidas em goblets até o momento da análise.

Para a descongelação, duas palhetas por ejaculado foram completamente submersas em banho-Maria 37 °C/ 30 seg. e em seguida imediatamente diluídas em 1 mL de BTS. Após essa diluição foi realizada uma segunda diluição dependendo da análise a ser realizada: em BTS para 30×10^6 para análises computadorizadas da motilidade, e em TALP para 5×10^6 para análises em citometria de fluxo.

6.2.6 Análises pós-descongelação

Todos os vinte e sete ejaculados foram avaliados quanto às características de motilidade pelo sistema CASA e quanto ao estado fisiológico das membranas dos espermatozoides por citometria de fluxo como descrito abaixo.

6.2.6.1 Avaliação da cinética espermática

A análise da motilidade e da cinética espermática foi realizada no sistema computadorizado Sperm Class Analyzer (SCA[®], ver. 5.0; Microptics S.L; Barcelona, Spain). Uma alíquota (5 µL) de sêmen diluído (30×10^6 espermatozoides/ mL) foi depositada em câmara de Makler pré-aquecida (37 °C) e avaliada em microscopia de contraste de fase (Nikon, Model Eclipse 80i) em aumento de 100x. Foram avaliados pelo menos cinco campos com 200 células com o software operando à 25 vídeo frames por segundo (25 Hz). Foram analisadas as seguintes variáveis: motilidade total (MT, %) que foi caracterizada como a porcentagem de espermatozoides que apresentavam VCL > 10 µm/s; motilidade progressiva (MP, %) que foi caracterizada como a porcentagem de espermatozoides que exibiam STR > 45%; espermatozoides rápidos (RAP, %) que foram considerados quando o VAP > 45 µm/s; velocidade curvelinear (VCL); velocidade de trajeto (VAP); velocidade linear (VSL);

linearidade (LIN); retilinearidade (STR); amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH); frequência de batimento (BCF). A hipermotilidade espermática (HIPER) foi avaliada usando os padrões estabelecidos por Pavanelli et al., (2017) incluídos na ferramenta Edit/Sort do software.

6.2.6.2 Avaliação do estado fisiológico das membranas espermáticas

Todas as análises por citometria de fluxo foram realizadas em um BD Accuri C6 (Becton & Dickinson Company, San Jose, CA – EUA) acoplado com um laser de argônio (488 nm) e um laser vermelho (640 nm). Os debris celulares foram excluídos das análises utilizando dois métodos 1) parte dos debris foram deixados de fora da seleção por tamanho e granulosidade interna, 2) e aqueles com mesmo tamanho e granulosidade interna semelhante aos espermatozoides foram excluídas da análise devido a quantidade muito baixa de DNA (sinal muito fraco de Syto59; Díaz et al., 2017). As aquisições foram realizadas em baixo fluxo (12 $\mu\text{L}/\text{min}$), e um total de 10.000 células (S59 positiva) foram contadas. Os detectores utilizados foram: FL1 (530/30 nm) para FITC-PSA, C11-Bodipy (fluorescência verde) e YO-PRO1, FL2 (585/40 nm) para JC-1 (fluorescência alaranjada) e Merocianina, FL3 (610/20 nm) para IP (iodeto de propídeo), e FL4 (675/25 nm) para S59.

A técnica da coloração tripla foi utilizada para a avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal com algumas modificações descritas por DÍAZ et al. (2017). Uma alíquota (150 μL) foi corada simultaneamente com IP (3,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$), FITC-PSA (0,6 mg/mL) e S59 (5 nM) por 10 minutos à 37 °C (DÍAZ et al., 2017). Após a incubação, as amostras foram diluídas em TALP (150 μL) e analisadas por citometria de fluxo. As células foram classificadas como: PIAI (porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal integras).

Para a avaliação do potencial de membrana mitocondrial foi utilizada a sonda fluorescente JC-1. Para a coloração, uma amostra (150 μL) foi adicionada de S59, IP e JC-1 (1 μM) e incubadas à 37 °C por 10 minutos (DÍAZ et al., 2017). As amostras foram diluídas em TALP e analisadas em citometria de fluxo. As células analisadas foram classificadas como membrana plasmática íntegra (PI negativo) e alto potencial de membrana mitocondrial (JC-1 alaranjado).

A fluidez dos fosfolipídios de membrana foi analisada com o auxílio da sonda fluorescente Merocianina 540 (FLESCH et al., 1999). Para isso, as amostras foram coradas com YP (50 nM) por 10 minutos (37 °C) e passada essa incubação foi adicionado S59 e incubado por mais 10 minutos/37 °C. A M540 (16,2 μM) foi então adicionada e incubada por mais 70

segundos (DÍAZ et al., 2017). As células foram avaliadas por citometria de fluxo quanto a intensidade mediana de fluorescência emitida pela M540 nas células com membrana plasmática íntegra (YP negativo).

Outro parâmetro avaliado foi a peroxidação lipídica da membrana plasmática com a utilização da sonda fluorescente C11-Bodipy^{581/591} (NEILD et al., 2005). As amostras (150 µL) foram incubadas com BP (6,67 µg/ mL) por 20 minutos à 37 °C e em seguida foram adicionados os corantes IP e S59 e incubados por mais 10 minutos (37 °C; DÍAZ et al., 2017). Em seguida as amostras foram diluídas e analisadas por citometria de fluxo para a intensidade mediana da fluorescência verde emitida pelo BP nas células com membrana plasmática íntegra (PI negativo).

6.2.7 Determinação da congelabilidade dos ejaculados

Para o presente experimento foi coletado um ejaculado de cada um dos vinte e sete cachacos utilizados, a fim de conseguir estudar uma população suficientemente grande que permitisse caracterizar bem os ejaculados de alta e baixa congelabilidade. Todos os ejaculados pós-descongelamento foram avaliados em duas etapas a saber: à campo (conforme descrito no item 6.2.4) e posteriormente com o auxílio de técnicas e equipamentos mais avançados (conforme descrito no item 6.2.6). A porcentagem pós-descongelamento de motilidade total (MT) e de membrana plasmática íntegra (MI) dos ejaculados criopreservados após 24 horas de HT (tempo padrão para a criopreservação do sêmen suíno) foram utilizadas para determinar a congelabilidade dos grupos. Foi realizado um índice de descongelamento descrito pela seguinte fórmula:
$$idesc = \frac{(MT_{innatura} - MT_{descongelado}) + (MI_{innatura} - MI_{descongelado})}{2}$$
. O *idesc* representa a média entre a redução da MT e da MI do sêmen *in natura* para o descongelado. Para a distribuição dos ejaculados, estes deveriam atender simultaneamente aos seguintes critérios: ejaculados de alta congelabilidade (EAC) – *idesc* < 62, MT > 25% e MI > 30%; ejaculados de baixa congelabilidade (EBC) – *idesc* > 63, MT ≤ 25% e MI ≤ 30%.

6.2.8 Coleta das amostras e protocolo de extração dos metabólitos

Após cada período de HT (0 e 24 horas) uma alíquota de sêmen (diluído em BTS 1:1; v:v) foi centrifugado (800 x g/ 10 min) para separação dos espermatozoides e plasma seminal.

O pellet de espermatozoides foi lavado ($2000 \times g/10 \text{ min}$) duas vezes em D-PBS (Dulbecco's Solução Fosfato Salina tamponada), a fim de garantir que todo plasma seminal tenha sido removido. As amostras de plasma seminal foram centrifugadas ($2000 \times g/10 \text{ min}$) por mais duas vezes, a fim de garantir que todos os espermatozoides tenham sido removidos das amostras. Após a separação as amostras foram mantidas à $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ até o momento das extrações.

Para a extração dos metabólitos seminais foi utilizado o protocolo descrito por Bligh e Dyer (1959). A cada uma das amostras de plasma seminal ($400 \mu\text{L}$; correspondente à $200 \mu\text{l}$ de plasma e $200 \mu\text{L}$ de BTS) e de espermatozoide ($200 \mu\text{L}$) foram adicionados $450 \mu\text{L}$ de metanol e misturados em vórtex por cinco minutos. Foram adicionados $200 \mu\text{L}$ de água destilada e $250 \mu\text{L}$ de clorofórmio e misturado em vórtex por 10 segundos. Depois da solução separar em duas fases, foi adicionado $100 \mu\text{L}$ de metanol e as amostras foram incubadas à $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos. Terminada a incubação foram adicionados $250 \mu\text{L}$ de água destilada e $250 \mu\text{L}$ de clorofórmio e as amostras foram centrifugadas ($1000 \times g/5 \text{ min}$). Após a centrifugação houve a formação de duas fases separadas por um anel proteico. A fase superior é considerada a fase polar onde deve ser encontrado os metabólitos. Essa fase foi cuidadosamente recuperada em microtubo, e os solventes foram secos em centrífuga à vácuo por 4 horas e em seguida congelados à $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ até o momento das análises.

6.2.9 Análise metabolômica não direcionada - Cromatografia líquida-espectrometria de massas de alta performance

As amostras extraídas foram avaliadas na Metabolite Profiling Facility localizado no Bindley Bioscience Center da Purdue University, West Lafayette, IN-EUA. Anteriormente as análises as amostras previamente secas foram reconstituídas em 95% de água deionizada, 5% de aceto nitrila e 0,1% de ácido fórmico ($100 \mu\text{L}$ para amostras de plasma seminal e $75 \mu\text{L}$ para amostras de espermatozoides), sonicadas por 5 minutos, em seguida centrifugadas $16.000 \times g/8 \text{ minutos}$ e então transferidas para os tubos de HPLC. As separações foram realizadas em um Agilent 1290 system (Palo Alto, CA, EUA), com fluxo da fase móbil de $0,45 \text{ mL/min}$. Os metabólitos foram analisados com uma coluna Waters HSS T3 ($1,8 \mu\text{m}$, $2,1 \times 100 \text{ mm}$), na qual as fases móveis A e B foram 0,1% de ácido fórmico em água deionizada e aceto nitrila, respectivamente. As condições iniciais foram 100:0, A:B mantida por 1 minuto, seguida por um gradiente linear de 70:30 aos 16 minutos, e 5:95 aos 21 minutos. O reequilíbrio da coluna cromatográfica foi realizado ao retornar à condição de 100:0 aos 22 minutos e mantida até 27 minutos. A análise de massas foi realizada com um Agilent 6545 Q-TOF espectrômetro de

massas com ESI positivo de 3.2 kV, temperatura do gás nitrogênio 325 °C, fluxo do gás de secagem 8.0 L/min, pressão do gás de nebulização 30 psig, tensão do fragmentador 135 V, skimmer 45 V, OCT RF 750 V. Os dados de massa (de 70 – 1500 m/z) foram coletados utilizando o software Agilent Mass Hunter Acquisition (v. B.06).

6.2.10 Análise estatística

A normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias foram verificadas, e quando necessário os dados foram transformados por função Log ou arcoseno. A interação entre os fatores congelabilidade (EAC, EBC) e refrigeração à 17 °C (0h, 24h) foram analisadas usando o PROC MIXED do programa SAS (SAS[®] Studio, Copyright[©] 2012-2017, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) e as diferenças entre os tratamentos foi avaliada pelo teste de Tukey-Kramer. Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$; e todos os resultados estão representados em média \pm erro padrão da média (EPM).

6.2.11 Bioinformática

A deconvolução e integração de picos foi realizada utilizando o software Agilent ProFinder (v. B.06). Após o pré-processamento foi realizada a filtragem dos dados com mais de 50% de valores ausente. Em seguida, todos os valores ausentes que ainda persistiam nos resultados foram substituídos pela mediana dos respectivos parâmetros. As análises estatísticas foram realizadas utilizando a plataforma *online* Metabolyt 4.0 (CHONG et al., 2019) para análises multivariadas. Os dados foram filtrados pelo desvio-padrão relativo (desvio-padrão/média). As áreas dos picos foram transformadas por *log-transformation* e normalizadas por *auto-scaling* (normalização e padronização em escala de intensidade). A análise de principais componentes (PCA) e a análise discriminantes por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) foram utilizadas para a verificação das diferenças globais entre os grupos e identificação dos *outliers*. A identificação de possíveis biomarcadores foi realizada de acordo com a significância da sua contribuição para a classificação no modelo PLS-DA pelo cálculo do VIP (variáveis importantes em projeção), sendo que aquelas com VIP maior que 2 foram consideradas importante para a separação dos grupos. A identificação dos metabólitos foi realizada nas plataformas *online* HMDB (<http://www.hmdb.ca>) e METLIN (<http://metlin.scripps.edu>).

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Caracterização da diferença de congelabilidade entre os ejaculados

Após a descongelação e análise dos ejaculados estes foram divididos em dois grupos de congelabilidade baseado na habilidade em resistir os processos de refrigeração, congelação e descongelação. Os ejaculados que apresentaram menores perdas calculadas pelo índice de descongelação descrito no item 6.2.7 foram considerados ejaculado de alta congelabilidade e os que apresentaram maiores perdas foram considerados ejaculados de baixa congelabilidade. O grupo EAC diferiu ($p < 0,05$) do EBC em relação ao índice de descongelação (Tabela 2).

Tabela 2: Caracterização da diferença de congelabilidade entre os ejaculados considerados de alta congelabilidade (EAC) e de baixa congelabilidade (EBC) pelo índice de descongelação (*idesc*).

	Categoria	Média	Máximo	Mínimo	P
<i>idesc</i>	EAC	56,03 ± 2,93 ^b	61,65	43,43	0,0111
	EBC	68,24 ± 2,26 ^a	74,30	63,05	

Fonte: Torres (2019).

6.3.2 Qualidade dos ejaculados *in natura* e pós-holding time

A qualidade dos ejaculados *in natura* e pós-refrigeração à 17 °C foi avaliada para garantir que as diferenças de congelabilidade fossem apenas oriundas das diferenças dos ejaculados em tolerar os processos refrigeração (até 5 °C), congelação e descongelação. Os ejaculados avaliados não apresentaram diferenças de motilidade total e progressiva nem de integridade de membrana plasmática e acrossomal tanto nas amostras *in natura* (Tabela 3) quanto nas amostras pós HT à 17 °C (Tabela 4).

Tabela 3 - Qualidade *in-natura* dos ejaculados considerados bons e maus congeladores e a média de todos os ejaculados congelados durante a fase experimental.

	Categoria	n	Média ± EPM	Máximo	Mínimo	P
Concentração espermática (x10 ⁶ espermatozoides/ mL)	EAC	5	1080,00 ± 152,20	1462,50	675,00	0,6175
	EBC	5	945,00 ± 210,66	1725,00	537,50	
	Média¹	27	961,11 ± 82,25	1950,00	312,50	
Motilidade total (%)	EAC	5	87,72 ± 1,17	90,30	83,50	0,112
	EBC	5	90,18 ± 0,28	90,70	89,40	
	Média¹	27	88,39 ± 0,64	93,60	79,80	
Motilidade Progressiva (%)	EAC	5	87,30 ± 1,20	89,70	83,00	0,0763
	EBC	5	90,50 ± 0,27	90,60	89,30	
	Média¹	27	88,10 ± 0,66	93,50	79,20	
Membrana Plasmática íntegra (%)	EAC	5	93,15 ± 1,58	97,00	88,25	0,7069
	EBC	5	94,15 ± 2,02	98,50	86,75	
	Média¹	27	92,33 ± 1,00	98,50	77,00	
Acrossomo íntegro (%)	EAC	5	97,00 ± 1,52	99,50	91,00	0,7492
	EBC	5	97,80 ± 0,70	99,25	96,00	
	Média¹	27	97,59 ± 0,33	100,00	91,00	

Fonte: Torres (2019).

EAC – ejaculados de alta congelabilidade; EBC – ejaculados de baixa congelabilidade.

¹ Média de todos os ejaculados criopreservados.

Uma vez que, a qualidade *in-natura* e pós-refrigeração à 17 °C não diferiram entre os grupos de congelabilidade, foi avaliado o efeito do uso do HT à 17 °C anteriormente à criopreservação na capacidade dos espermatozoides em suportarem os danos ocasionados nos processos de refrigeração (a 5 °C) e congelação.

Tabela 4 - Qualidade pós-refrigeração à 17 °C dos ejaculados considerados bons e maus congeladores e a média de todos os ejaculados congelados durante a fase experimental.

	Categoria	n	Média ± EPM	Máximo	Mínimo	P
Motilidade total (%)	EAC	5	88,60 ± 2,42	92,30	79,10	0,6140
	EBC	5	86,30 ± 3,65	97,70	78,90	
	Média¹	27	88,02 ± 1,05	98,40	78,90	
Motilidade Progressiva (%)	EAC	5	87,98 ± 2,78	92,30	77,10	0,6396
	EBC	5	85,70 ± 3,78	97,70	78,40	
	Média¹	27	87,49 ± 1,10	98,40	77,10	
Membrana Plasmática íntegra (%)	EAC	5	94,80 ± 1,35	97,50	90,00	0,3581
	EBC	5	92,65 ± 1,75	96,50	86,50	
	Média¹	27	93,07 ± 0,76	98,25	84,00	
Acrossomo íntegro (%)	EAC	5	97,70 ± 0,64	99,00	95,50	0,4105
	EBC	5	98,40 ± 0,48	99,50	97,00	
	Média¹	27	98,28 ± 0,24	100,00	95,00	

Fonte: Torres (2019).

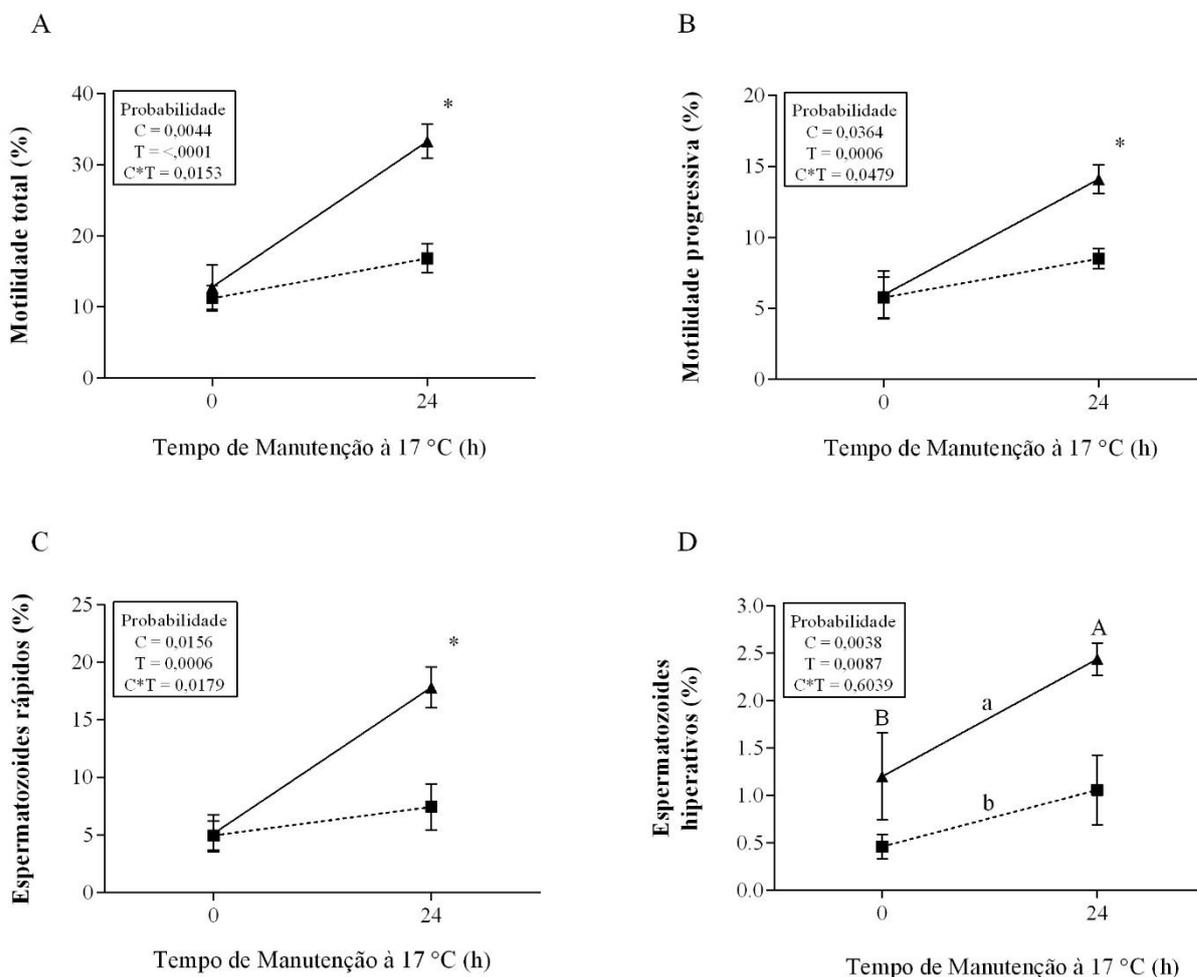
EAC – ejaculados de alta congelabilidade; EBC – ejaculados de baixa congelabilidade.

¹ Média de todos os ejaculados criopreservados.

6.3.3 Cinética espermática

As diferenças de criotolerância das características de motilidade do ejaculado suíno são inerentes ao uso do HT à 17 °C no protocolo de criopreservação. A motilidade total e progressiva e a porcentagem de espermatozoides rápidos diferiram ($P < 0,05$) entre os grupos de congelabilidade (EAC; EBC) quando os ejaculados foram criopreservado após 24 horas à 17 °C (Figura 6A, 6B, 6C). Por outro lado, quando os ejaculados foram criopreservados sem o uso de HT à 17 °C anterior a criopreservação, os ejaculados considerados bons e maus congeladores não diferiram ($P > 0,05$; Fig 6A, 6B, 6C). Já para algumas características de cinética espermática como VSL, VAP, LIN e STR as diferenças de congelabilidade entre os grupos são observadas somente ($P < 0,05$) quando os ejaculados são submetidos diretamente (0h de HT à 17 °C) ao processo de criopreservação (Tabela 5). Para a porcentagem de espermatozoides hiperativos não foi observada a interação ($P > 0,05$) entre congelabilidade (EAC, EBC) e HT à 17 °C (0h, 24h).

Figura 6 - Características da motilidade espermática pós-descongelamento dos ejaculados de alta (EAC; ▲) e baixa (EBC; ■) congelabilidade em protocolos com e sem *holding time* à 17 °C anterior à criopreservação.



Fonte: Torres (2019).

^{a-b} Letras minúsculas representam diferença estatística entre as categorias de congelabilidade ($P < 0,05$); ^{A-B} Letras maiúsculas representam diferença estatística entre os períodos *HT* à 17 °C ($P < 0,05$); * Asterisco representa diferença de congelabilidade dentro do período de refrigeração à 17 °C indicado ($P < 0,05$).

Os ejaculados criopreservados após 24 horas de HT à 17 °C apresentaram mais células hiperativadas ($P < 0,05$) do que aqueles criopreservados logo após a coleta (Figura 6D). Já os ejaculados considerados bons congeladores apresentaram maior ($P < 0,05$) porcentagem de células hiperativas quando comparado aos maus congeladores (Figura 6D). As demais variáveis da cinética espermática não foram significativas ($P > 0,05$) para nenhum dos fatores avaliados (Tabela 5).

Tabela 5 - Média \pm EPM das variáveis da cinética espermática pós-descongelamento dos ejaculados de alta (EAC) e baixa (EBC) congelabilidade com e sem adição de *holding time* à 17 °C anterior à criopreservação.

Cinética espermática	Categoria (C)	Holding time à 17 °C (T)		Média ²	Probabilidade		
		0	24		C	T	C*T
VCL ($\mu\text{m/s}$)	EAC	46,16 \pm 3,63	57,18 \pm 1,82	51,67 \pm 2,65	0,4836	0,1188	0,2773
	EBC	47,48 \pm 4,12	49,86 \pm 5,45	48,82 \pm 3,24			
	Média¹	46,97 \pm 2,60	53,52 \pm 2,97				
VSL ($\mu\text{m/s}$)	EAC	16,68 \pm 1,10 ^b	25,56 \pm 1,85 ^a	21,12 \pm 1,79	0,2882	0,0386	0,0048
	EBC	21,54 \pm 2,57 ^a	20,60 \pm 1,80 ^a	21,07 \pm 1,49			
	Média¹	19,11 \pm 1,55	23,08 \pm 1,47				
VAP ($\mu\text{m/s}$)	EAC	23,60 \pm 1,51 ^b	34,14 \pm 2,32 ^a	28,87 \pm 2,19	0,9317	0,0645	0,0141
	EBC	29,93 \pm 1,53 ^a	28,20 \pm 2,86 ^a	28,97 \pm 1,66			
	Média¹	26,41 \pm 1,50	31,17 \pm 2,00				
LIN (%)	EAC	38,14 \pm 1,07 ^b	44,52 \pm 1,97 ^a	41,33 \pm 1,50	0,2671	0,3208	0,0345
	EBC	44,76 \pm 2,85 ^a	42,30 \pm 1,22 ^a	43,53 \pm 1,52			
	Média¹	41,45 \pm 1,81	43,41 \pm 1,54				
STR (%)	EAC	70,74 \pm 0,92 ^b	74,86 \pm 1,53 ^a	72,80 \pm 1,09	0,0782	0,8250	0,0418
	EBC	77,66 \pm 2,70 ^a	74,30 \pm 0,98 ^a	75,98 \pm 1,46			
	Média¹	74,20 \pm 1,77	74,58 \pm 0,86				
ALH (μm)	EAC	3,64 \pm 0,22	3,56 \pm 0,05	3,6 \pm 0,11	0,5669	0,6463	0,3634
	EBC	3,38 \pm 0,20	3,62 \pm 0,16	3,5 \pm 0,13			
	Média¹	3,51 \pm 0,15	3,59 \pm 0,08				
BCF (Hz)	EAC	5,68 \pm 0,36	6,00 \pm 0,16	5,84 \pm 0,19	0,2202	0,8577	0,2653
	EBC	6,48 \pm 0,45	6,04 \pm 0,28	6,26 \pm 0,26			
	Média¹	6,08 \pm 0,30	6,02 \pm 0,15				

Fonte: Torres (2019).

VCL – velocidade curvilinear; VSL – velocidade linear; VAP – velocidade de trajeto; LIN – linearidade; STR – retilinearidade; ALH – amplitude de deslocamento lateral de cabeça; BCF – frequência de batimento.

Média¹: Média dos períodos de refrigeração à 17 °C

Média²: Média das categorias de congelabilidade

^{a-b} Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística ($P < 0,05$).

6.3.4 Estado fisiológico das membranas espermáticas

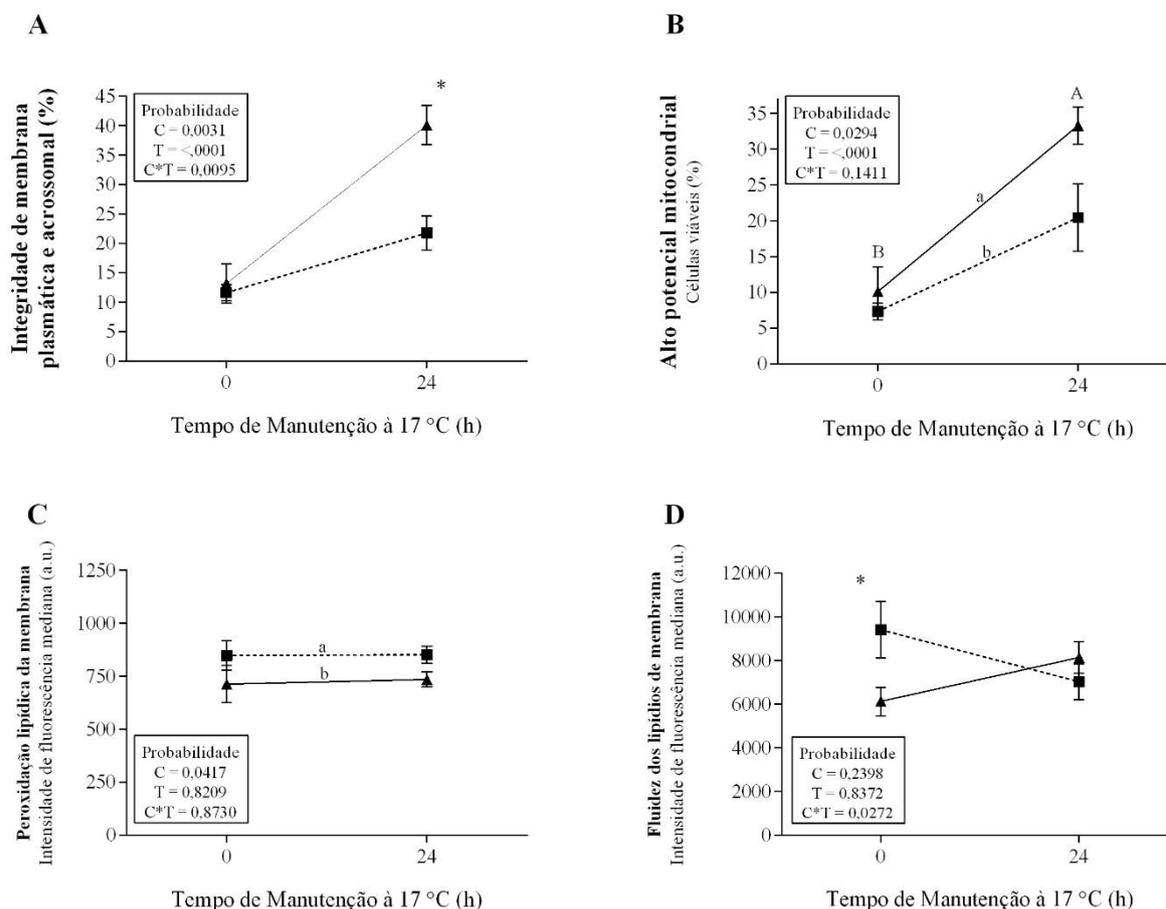
Nos ejaculados suínos criopreservados após 24 horas à 17 °C é possível diferenciar ($P < 0,05$) os grupos de criotolerância em relação às células com membrana plasmática e acrossomal íntegras (Figura 7A); nesse caso, os ejaculados considerados bons congeladores apresentam mais células com membrana plasmática e acrossomal íntegras. Enquanto para os mesmos ejaculados criopreservados sem a adição de período de refrigeração à 17 °C não é possível ($P > 0,05$) realizar essa diferenciação (Figura 7A).

O potencial de membrana mitocondrial não apresentou ($P > 0,05$) interação entre congelabilidade (EAC, EBC) e HT à 17 °C (0h, 24h). Os ejaculados criopreservados após 24 horas de refrigeração à 17 °C apresentaram uma maior proporção ($P < 0,05$) de células viáveis com alto potencial mitocondrial do que aquelas criopreservadas imediatamente após a coleta (Figura 7B). Os ejaculados considerados bons congeladores apresentaram mais células ($P < 0,05$) viáveis com alto potencial mitocondrial comparado com os maus congeladores (Figura 7B).

A fluidez dos lipídios da membrana dos espermatozoides criopreservados em protocolos sem a utilização de período de refrigeração à 17 °C permite a diferenciação ($P < 0,05$) dos grupos de congelabilidade (EAC, EBC; Figura 7C), sendo que os ejaculados considerados maus congeladores apresentam maiores níveis de fluidez de membrana. Já quando a criopreservação ocorreu 24 horas após a refrigeração à 17 °C a diferenciação dos grupos de congelabilidade não foi possível ($P > 0,05$; Figura 7C).

Os resultados de peroxidação lipídica da membrana plasmática não mostraram ($P > 0,05$) interação entre congelabilidade (EAC, EBC) e períodos refrigeração à 17 °C (0h, 24h). Os ejaculados considerados maus congeladores apresentam maiores níveis ($P < 0,05$) de peroxidação lipídica da membrana plasmática que os bons congeladores independentemente do período de refrigeração utilizado (Figura 7D).

Figura 7 - Características das membranas espermáticas pós-descongelamento dos ejaculados de alta (EAC; ▲) e baixa (EBC; ■) congelabilidade com e sem adição de período de *holding time* à 17 °C anterior à criopreservação.



Fonte: Torres (2019).

^{a-b} Letras minúsculas representam diferença estatística entre as categorias de congelabilidade ($P < 0,05$); ^{A-B} Letras maiúsculas representam diferença estatística entre os períodos de refrigeração à 17 °C ($P < 0,05$); * Asterisco representa diferença de congelabilidade dentro do período de refrigeração à 17 °C indicado ($P < 0,05$).

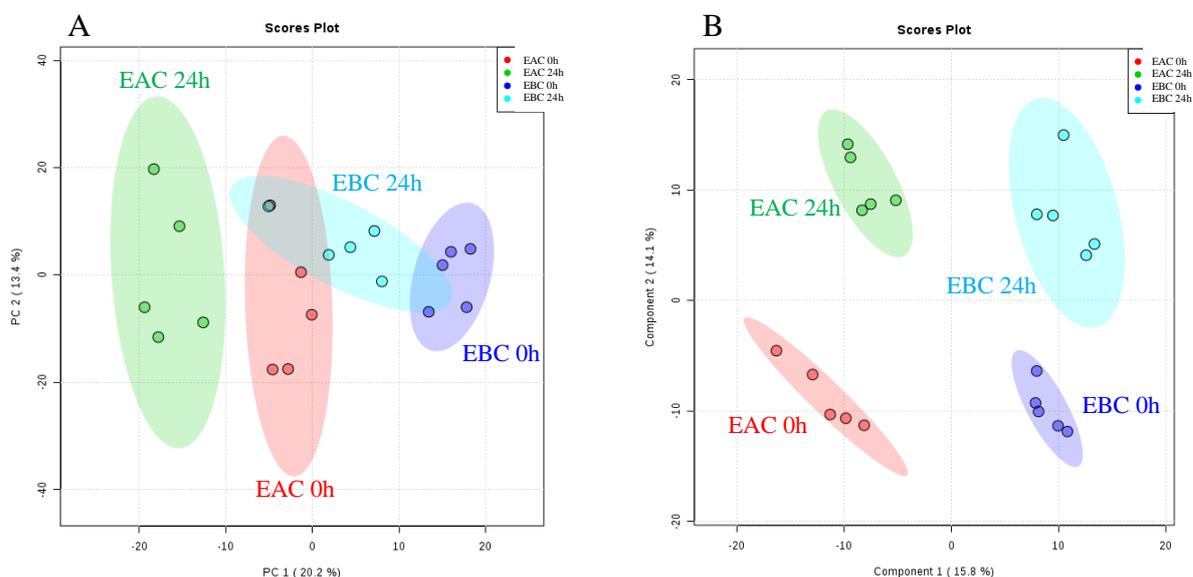
6.3.5 Metaboloma dos espermatozoides de ejaculados de alta e baixa congelabilidade criopreservados após 0 e 24 horas de *holding time*

Foram identificados 1393 metabólitos nos espermatozoides dos ejaculados com alta e baixa congelabilidade criopreservados após 0 e 24 horas de HT, após o pré-processamento realizado no software Agilent ProFinder (v. B.06). Após a filtragem de pelo critério de menos de 50% de presença foram removidos 96 analitos, e a filtragem dos dados 25% maiores que o

desvio-padrão relativo à média eliminou 515 analitos, o que resultou em 782 metabólitos que passaram pelas análises de bioinformática.

As análises multivariadas (análise de componente principal - ACP) dos espermatozoides suínos indicaram uma separação distinta entre os grupos quanto a congelabilidade e seu respectivo HT (Figura 8A); sendo que os ejaculados de alta congelabilidade criopreservados após 24 horas de HT foram clusterizados a uma maior distância dos demais grupos, caracterizando que o metaboloma desse grupo de ejaculados é mais distante molecularmente que ambos os grupos de baixa congelabilidade e também dos ejaculados de alta congelabilidade criopreservados sem o uso de HT. O componente principal 1 foi responsável por 20,2% da variação e o componente principal 2 por 13,2%; a soma dos 5 primeiros principais componentes explicou 57,2% da variação total.

Figura 8 – Representações gráficas das análises multivariadas (A) Análise de componente principal e (B) Análise discriminante de mínimos quadrados parciais das amostras de espermatozoides suínos.



Fonte: Torres (2019).

EAC 0h: ejaculados de alta congelabilidade criopreservados após 0 horas de *holding time* à 17 °C; EAC 24h: ejaculados de alta congelabilidade criopreservados após 24 horas de *holding time* à 17 °C; EBC 0h: ejaculados de baixa congelabilidade criopreservados após 0 horas de *holding time* à 17 °C; EBC 24h: ejaculados de baixa congelabilidade criopreservados após 24 horas de *holding time* à 17 °C.

A análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) é um método de classificação supervisionado, ou seja, o método tem conhecimentos dos tratamentos/grupos no momento de separação das amostras, por isso a clusterização observada na Figura 8B tem um maior separação que na análise de componente principal. Para confirmar os resultados gerados na separação pelo PLS-DA foi realizada a análise de cross-validation pelo método LOOCV no qual foi possível observar que o modelo gerado com 2 componentes foi bem construído ($R^2 = 0,97712$) e a predição do modelo foi satisfatória ($Q^2 = 0.79623$). Com isso é possível afirmar que o perfil dos analitos presentes nos espermatozoides significativamente diferentes entre os grupos.

A fim de verificar os analitos significantes entre os grupos foi realizado o teste de Variáveis Importantes em Projeção (VIP) no modelo PLS-DA, no qual foram identificados 21 metabólitos que apresentaram VIP maior que 2 (Figura 9A). Os analitos que apresentaram diferença na abundância segundo os critérios previamente estabelecidos foram identificados nas plataformas *online* HMDB e METLIN (Tabela 6). Alguns metabólitos apresentaram elevada abundância nos ejaculados com baixa congelabilidade comparado com os ejaculados de alta congelabilidade, independentemente do período de HT pré-criopreservação utilizado (Figura 9B), como a *Pyroglutamic acid*, TG (12:0/16:0/18:0) e PI (21:0/22:6). Outros metabólitos encontrados nos espermatozoides apresentaram comportamento oposto com elevada abundância nos ejaculados com alta congelabilidade comparado com os ejaculados de baixa congelabilidade, independentemente do HT utilizado (Figura 9B), como a *Dimethylamine* e a *2-Methylbutyrylcarnitine*. Já os metabólitos *L-N2-(2-Carboxyethyl) arginine* e *S-(2-Methylbutanoyl) - dihydrolipoamide* apresentaram alta abundância somente nos ejaculados de baixa criotolerância após 24 horas de HT (Figura 9B). O metabólito com m/z 375.2512 não foi significativo nos critérios estabelecidos mas apresentou um padrão interessante na análise de *heat-map* (Figura 10), possuindo uma alta abundância apenas nos ejaculados de alta criotolerância após 24 horas de HT; esse metabólito foi então identificado como MG (18:3(N-3)/0:0/0:0).

Tabela 6 – Identificação dos analitos detectados nos espermatozoides de suínos com Variável Importante em Projeção (VIP) maior que 2.

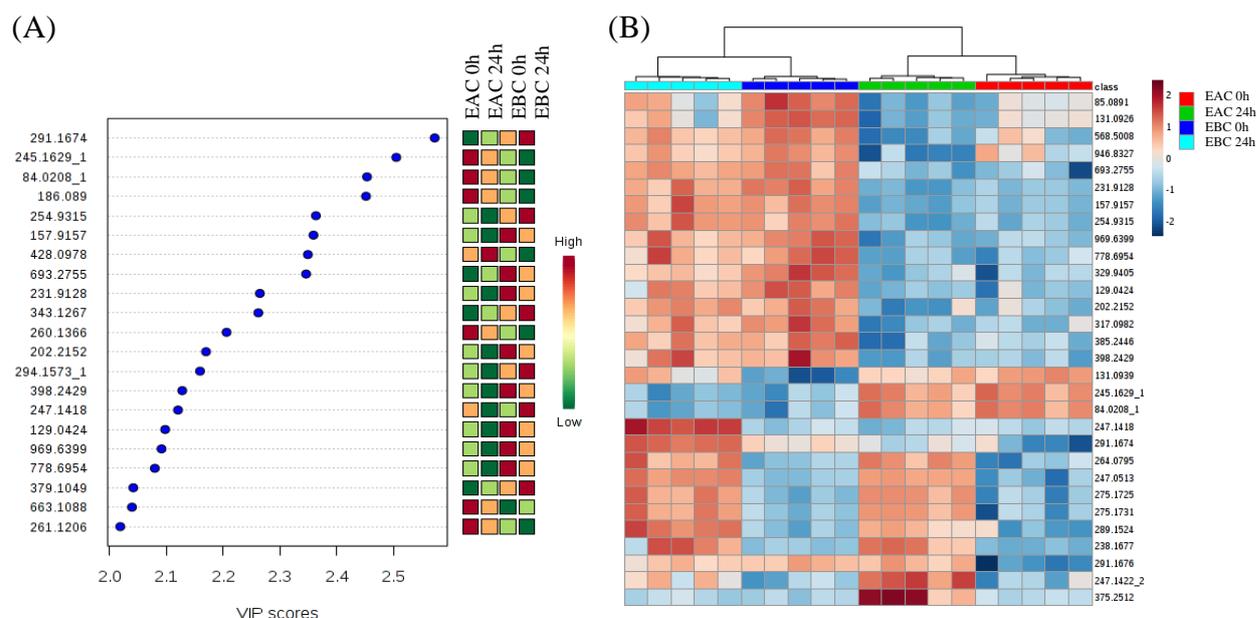
m/z	Nome do composto	Fórmula química
84.0208	Dimetilamina	C ₂ H ₇ N
129.0424	Pyroglutamic acid	C ₅ H ₇ NO ₃
157.9157	não identificado	
186.089	2-pirroloilglicina	C ₇ H ₈ N ₂ O ₃
202.2152	não identificado	
231.9128	não identificado	
245.1629	2-Methylbutyrylcarnitine	C ₁₂ H ₂₃ NO ₄
247.1418	L-N2-(2-Carboxyethyl)arginine	C ₉ H ₁₈ N ₄ O ₄
254.9315	não identificado	
260.1366	Glutamylisoleucine	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₅
261.1206	Succinylcarnitine	C ₁₁ H ₁₉ NO ₆
291.1674	não identificado	
294.1573	N-(1-Deoxy-1-fructosyl)leucine	C ₁₂ H ₂₃ NO ₇
343.1267	Glucose-1,3-mannose oligosaccharide	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁
379.1049	S-Lactoylglutathione	C ₁₃ H ₂₁ N ₃ O ₈ S
398.2429	20-HETE ethanolamide	C ₂₂ H ₃₇ NO ₃
428.0978	7,11,12-Triacetylcoumestan	C ₂₁ H ₁₄ O ₉
663.1088	Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)	C ₂₁ H ₂₇ N ₇ O ₁₄ P ₂
693.2755	não identificado	
778.6954	TG(12:0/16:0/18:0)	C ₄₉ H ₉₄ O ₆
969.6399	PI(21:0/22:6)	C ₅₂ H ₉₂ NO ₁₃ P

Fonte: Torres (2019).

A intensidade relativa dos analitos gerados por LC/MS foi substituída por pequenos quadrados coloridos na Figura 10, nos quais as cores quentes representam maiores abundâncias e as cores frias representam menores abundâncias. Com isso, a matriz de dados foi transformada no *heat-map* padronizada com 30 metabólitos (Figura 9B). Ainda na análise de *heat map* os tratamentos foram ordenados somente após o agrupamento hierárquico dos dados, e o dendograma referente a esse ordenamento está apresentado na parte superior do *heat-map* (Figura 9B). É possível observar, pelo dendograma, que a abundância dos metabólitos dos espermatozoides apresentados para o grupo EAC 24 horas é mais próximo da abundância dos metabólitos dos espermatozoides do grupo EAC 0 horas do que a qualquer um dos grupos de ejaculados de baixa criotolerância. E a recíproca é verdadeira, ou seja, a abundância dos 30 metabólitos de maior importância dos espermatozoides do grupo EBC 24 horas é mais próximo

da abundância dos metabólitos dos espermatozoides do grupo EBC 0 horas do que a qualquer um dos grupos de ejaculados de alta criotolerância.

Figura 9 – Representação gráfica (A) das variáveis importantes em projeção (VIP) e da (B) análise de *heat-map* metabólitos presentes nos espermatozoides de suínos.



Fonte: Torres (2019).

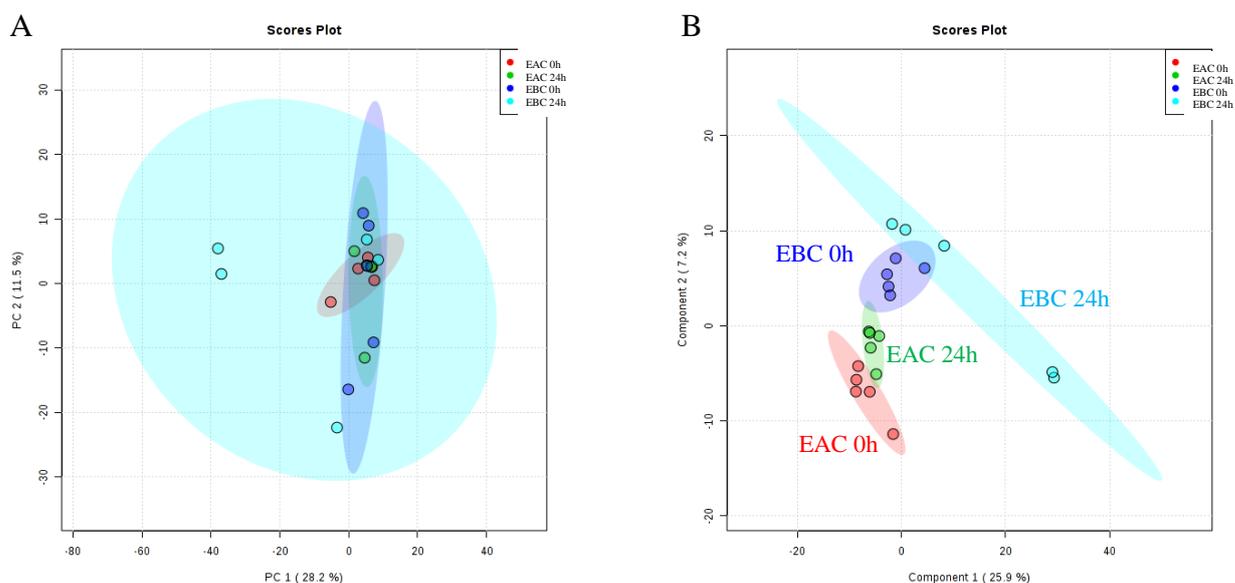
EAC 0h: ejaculados de alta congelabilidade criopreservados após 0 horas de *holding time* à 17 °C; EAC 24h: ejaculados de alta congelabilidade criopreservados após 24 horas de *holding time* à 17 °C; EBC 0h: ejaculados de baixa congelabilidade criopreservados após 0 horas de *holding time* à 17 °C; EBC 24h: ejaculados de baixa congelabilidade criopreservados após 24 horas de *holding time* à 17 °C.

6.3.6 Metaboloma do plasma seminal de ejaculados de alta e baixa congelabilidade criopreservados após 0 e 24 horas de *holding time*

Foram identificados 1286 analitos no plasma seminal de ejaculados com alta e baixa congelabilidade criopreservados após 0 e 24 horas de HT, após o pré-processamento realizado no software Agilent ProFinder (v. B.06). Após a filtragem de pelo menos 50% de presença foram removidos 240 analitos, e a filtragem dos dados 20% maiores que o desvio-padrão relativo à média eliminou 419 metabólitos, o que resultou em 627 metabólitos que passaram pelas análises de bioinformática.

A análise de componente principal não foi eficiente para realizar uma adequada separação das amostras nos respectivos grupos (Figura 10A). Como essa é uma análise não supervisionada, ou seja, durante a análise não há conhecimento do tratamento/grupo de cada amostra, foi realizada a análise de PLS-DA para tentar visualizar como a covariância das amostras interferem na clusterização dos grupos. No PLS-DA o componente 1 explicou 25,9% da covariância e o componente 2 explicou 7,2% (Figura 10b). Foi possível ainda observar que os grupos de congelabilidade possuem uma boa separação, bem como os períodos de HT dentro de cada grupo, apesar desses últimos serem mais próximos entre si. A fim de verificar a eficiência da separação pela análise do PLS-DA foi realizado o teste de cross-validation, sendo que o modelo gerado por 2 componentes foi bem constituído ($R^2 = 0,95376$) mas a predição do modelo não foi satisfatória ($Q^2 = 0,1932$).

Figura 10 – Representações gráficas das análises multivariadas (A) Análise de principal componente (PCA) e (B) Análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) das amostras de plasma seminal suínos.



Fonte: Torres (2019).

EAC 0h: ejaculados de alta congelabilidade criopreservados após 0 horas de *holding time* à 17 °C; EAC 24h: ejaculados de alta congelabilidade criopreservados após 24 horas de *holding time* à 17 °C; EBC 0h: ejaculados de baixa congelabilidade criopreservados após 0 horas de *holding time* à 17 °C; EBC 24h: ejaculados de baixa congelabilidade criopreservados após 24 horas de *holding time* à 17 °C.

Para averiguar os metabólitos que a diferenciariam entre os tratamentos foi realizado o teste de Variáveis importantes em projeção (VIP) no modelo PLS-DA. Treze analitos tiveram VIP maior que 2 (Figura 11A). Os analitos que apresentaram diferença na abundância segundo os critérios previamente estabelecidos foram identificados nas plataformas *online* HMDB e METLIN (Tabela 7). Alguns metabólitos, como ácido succínico apresentaram alta abundância em ejaculados de baixa congelabilidade quando comparado com os ejaculados de alta congelabilidade, independentemente do HT utilizado. As outras moléculas como as de *m/z* 229.1313; 205.0738; 118.0277; e 170.0578 tiveram uma maior abundância nos ejaculados que passaram por 24 horas de HT à 17 °C comparado com aqueles que não foram submetidos ao HT (0 horas), independente da congelabilidade dos ejaculados.

Tabela 7 – Identificação dos analitos detectados no plasma seminal de suínos com Variável Importante em Projeção (VIP) maior que 2.

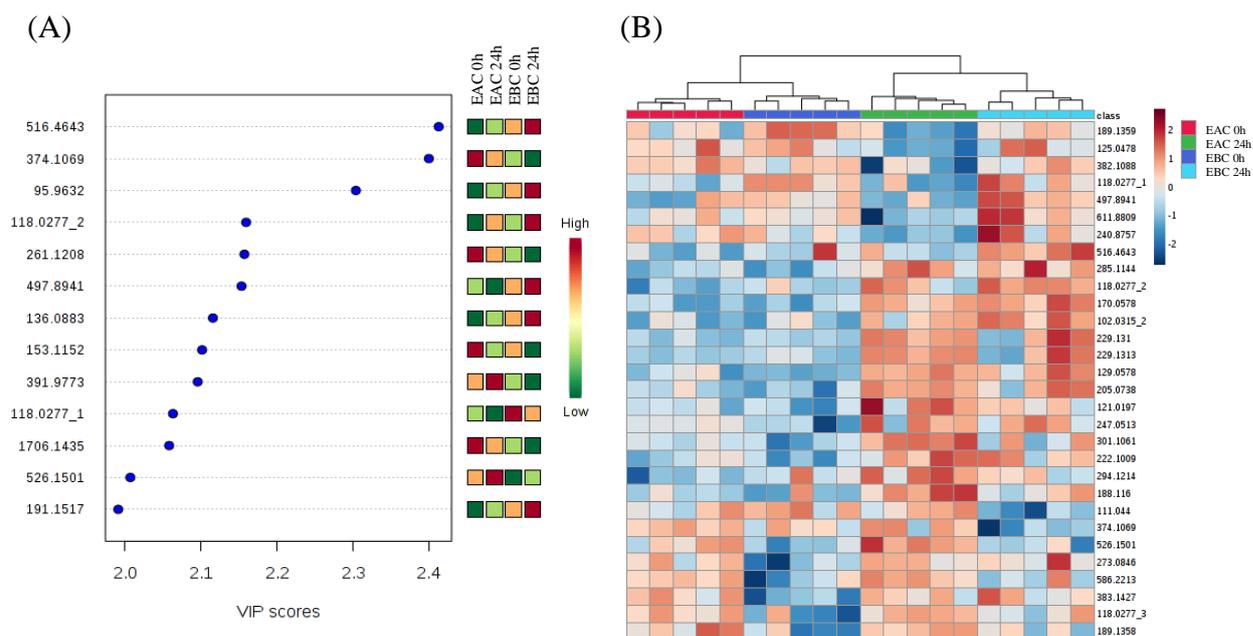
<i>m/z</i>	Nome	Fórmula química
95.9632	Selenium	Se
118.0277	Ácido succínico	C ₄ H ₆ O ₄
136.0883	não identificado	
153.1152	não identificado	
261.1208	Cytidine	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₅
374.1069	5-Amino-6- (5'-fosforibitilamino) uracila	C ₉ H ₁₇ N ₄ O ₉ P
391.9773	não identificado	
497.8941	não identificado	
516.4643	DG(i-14:0/0:0/a-13:0)	C ₃₀ H ₅₈ O ₅
526.1501	não identificado	
1706.1435	não identificado	

Fonte: Torres (2019).

A fim de verificar a relação da intensidade relativa dos analitos gerados por LC/MS foi realizada a análise de *heat-map* com a padronização de 30 metabólitos (Figura 11B). Os grupos foram ordenados após a clusterização hierárquica dos dados e o dendograma está apresentado na parte superior do *heat-map* (Figura 11B). Com esse agrupamento é possível verificar (pelo dendograma), que diferentemente do observado com os resultados do *heat-map* do metabólitos dos espermatozoides, no plasma seminal, aparentemente a intensidade relativa dos 25 metabólitos mais importantes são mais próximas entre os grupos de HT, ou seja, o plasma seminal dos ejaculados que não passaram por HT (0 horas) possuem um metaboloma que mais se aproxima entre si, independentemente da congelabilidade; e também o plasma

seminal dos ejaculados que permaneceram por 24 horas à 17 °C anteriormente à criopreservação possuem um metaboloma mais próximo entre si independentemente da congelabilidade.

Figura 11 – Representação gráfica (A) das variáveis importantes em projeção (VIP) e da (B) análise de *heat-map* metabólitos presentes nos espermatozoides de suínos.



Fonte: Torres (2019).

EAC 0h: ejaculados de alta congelabilidade criopreservados após 0 horas de *holding time* à 17 °C; EAC 24h: ejaculados de alta congelabilidade criopreservados após 24 horas de *holding time* à 17 °C; EBC 0h: ejaculados de baixa congelabilidade criopreservados após 0 horas de *holding time* à 17 °C; EBC 24h: ejaculados de baixa congelabilidade criopreservados após 24 horas de *holding time* à 17 °C.

6.4 DISCUSSÃO

A congelabilidade dos espermatozoides suínos está mais relacionada as diferenças individuais dos que ao processo de criopreservação propriamente dito (MEDRANO et al., 2009). Entretanto, os resultados do presente experimento mostram uma interação de algumas variáveis entre congelabilidade (EAC, EBC) e refrigeração à 17 °C (0h, 24h), ou seja a inclusão (ou não) da refrigeração à 17 °C nos protocolos de criopreservação do sêmen suíno está associada a remodelação da habilidade dos espermatozoides em suportar o choque-frio. Além do mais, foi possível observar que a congelabilidade dos espermatozoides não está somente

relacionada as diferenças individuais (diferença dos metabólitos presentes nos espermatozoides) mas existe uma relação mútua com as diferenças geradas no potencial de criotolerância pelo uso do HT anterior a criopreservação dos metabólitos presentes no plasma seminal.

O efeito do HT nas características de motilidade mostrou que a diferença de congelabilidade entre os ejaculados suínos é somente evidenciada quando os espermatozoides são mantidos por 24 horas à 17 °C em contato com o próprio plasma seminal. Os espermatozoides oriundos de ejaculados com alta congelabilidade possuem uma maior abundância de NAD (nicotinamida adenina dinucleótido; como pode ser observado na análise de VIP). A NAD é uma importante coenzima que regula várias vias metabólicas incluindo a glicólise, a fosforilação oxidativa e a β -oxidação (BISTOCCHI et al., 1968; YAKU et al., 2019). Se os espermatozoides de ejaculados com alta congelabilidade possuem, antes e durante o HT, uma maior abundância de NAD, essa maior abundância pode ser mantida após o processo de congelação e descongelação, gerando uma maior taxa de glicólise e possivelmente de fosforilação oxidativa, e conseqüentemente de ATP. Entretanto, o aumento da motilidade total e progressiva foi observado apenas nas amostras de alta congelabilidade que permaneceram em HT por 24 horas; tais efeitos podem ser decorrentes das diferenças observadas na abundância dos metabólitos entre 0 e 24 horas de HT.

A membrana plasmática é uma bicamada lipídica altamente fluída e dinâmica, composta basicamente de fosfolipídios, colesterol e proteínas (KURZ et al., 2005). Os espermatozoides suínos possuem diversas particularidades na membrana plasmática quando comparado as outras espécies domésticas. O folheto externo da bicamada lipídica dos espermatozoides suínos é composto principalmente por PC (fosfatidilcolina) e SM (esfingomielina), enquanto no folheto interno predominam a PS (fosfatidilserina) e a PE (fosfatidiletanolamina; FLESCH; GADELLA, 2000; KURZ et al., 2005). A alteração abundância de fosfatidinositol (PI; PI(21:0/22:6)) entre os espermatozoides de ejaculados com alta e baixa criotolerância pode ter alterado além da estrutura da membrana a capacidade da membrana suportar as alterações de temperatura; já que este não é um lipídio muito abundante nas membranas de espermatozoides suínos e os ejaculados de baixa criotolerância apresentaram maiores intensidades relativas. O que pode auxiliar na compreensão dos resultados de integridade das membranas plasmática e acrossomal, sendo que os espermatozoides de ejaculados EAC criopreservados após 24 horas de HT foram mais resistentes que os de EBC criopreservados com e sem HT e mesmo os EAC criopreservados sem HT. Da mesma maneira, os espermatozoides de ejaculados de baixa congelabilidade possuem menores porcentagens de

integridade de membrana plasmática e acrossomal (quando criopreservados após 24 horas de HT), e consequentemente um maior percentual de células com acrossoma lesionado/reagido. Essa população de espermatozoides possui uma maior abundância de PI(21:0/22:6), e a hidrolização de fosfolipídios dessa classe (fosfatidilinositol) pela fosfolipase C libera o inositol da membrana que é responsável pela liberação de Ca^{2+} que por sua vez pode entrar na via da capacitação e/ou da reação acrossomal (DOMINO; GARBERS, 1989; ROLDAN; HARRISON, 1990; ROLDAN; HARRISON, 1992).

Naz et al., (1995) verificaram que a alteração do peptídeo T α 1 pela adição de *pyroglutamic acid* no N-terminal serina ou -NH₂ reduziu a capacidade fertilizante dos espermatozoides de humanos. No presente experimento, o *pyroglutamic acid* apresentou maior abundância em espermatozoides oriundos de ejaculados de alta congelabilidade. A criopreservação dos espermatozoides de suínos na ausência de HT aumentou a fluidez da membrana em ejaculados de baixa congelabilidade. Nesse grupo de ejaculados o *pyroglutamic acid* apresentou baixa intensidade relativa, podendo estar relacionado a alteração peptídeo T α 1 e possível diminuição da fertilidade, a qual pode ser decorrente do aumento das alterações semelhantes a capacitação, como o aumento da fluidez da membrana.

A *2-Methylbutyrylcarnitine* pertence à classe das acilcarnitinas. Esse metabólito está presente em maior abundância nos ejaculados de alta criotolerância comparado com os de baixa criotolerância. Para o controle da concentração de acetil-CoA, o excesso dessa coenzima é transformado em acilcarnitinas, uma vez que, altos níveis de acetil-CoA são responsáveis por inibir a atividade da piruvato desidrogenase (ČEŘOVSKÝ et al., 2009). Com os níveis de acetil-CoA regulados ocorre um aumento da classe de acilcarnitinas, como observado nos ejaculados de alta congelabilidade. Portanto, as vias do ciclo de Krebs e consecutivamente da cadeia de transporte de elétrons seguem sem alteração (NELSON; COX, 2013) resultando em um maior potencial de membrana mitocondrial nos espermatozoides oriundo de EAC quando comparado com EBC. O succinato (forma ionizada do ácido succínico [*succinic acid*]) é um componente do ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs) capaz de doar elétrons na cadeia de transporte de elétrons (NELSON; COX, 2013). Como observado anteriormente o NAD é um metabólito de baixa abundância em EBC. A formação de succinato no ciclo do ácido cítrico é dependente de NAD (NELSON; COX, 2013). Possivelmente, essa “deficiência” de NAD em EBC está relacionado à maior abundância de ácido succínico no plasma seminal de ejaculados de baixa congelabilidade; além do baixo potencial mitocondrial observado nos ejaculados de baixa congelabilidade.

Li et al., (2018) afirmam em seu estudo recente que a congelabilidade dos espermatozoides suínos é mais intrinsecamente relacionada aos espermatozoides do que ao plasma seminal que os rodeia; entretanto, esses autores fazem essa afirmação em relação ao potencial de congelabilidade das diferentes frações do ejaculado, não se referindo a ejaculados com diferentes potenciais de congelabilidade. Quando essa afirmação é extrapolada para o potencial de congelabilidade dos ejaculados ela passa a ser falsa; uma vez que, no presente experimento foi possível comprovar que as diferenças de criotolerância dos ejaculados está relacionado as diferenças de criotolerância dos próprios espermatozoides associada com as diferenças causadas pelo uso do HT nos protocolos de criopreservação, gerando assim a interação entre uso do HT e da categoria de congelabilidade (EAC ou EBC) nas características da fisiologia espermática analisadas nos espermatozoides descongelados.

REFERÊNCIAS

- ALMLID, T.; JOHNSON, L. A. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. **Journal of Animal Science**. v. 66, n.11, p. 2899-2905, 1988.
- BARTH, A.; OKO, R. J. Preparation of semen for morphological examination. In: BARTH, A.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa State Univ Press, 1989. p. 8–12.
- BIENIEK, J. M.; DRABOVICH, A. P.; LO, K. C. Seminal biomarkers for the evaluation of male infertility. **Asian Journal of Andrology**. v. 18, n. 3, p. 426–433, 2016
- BISTOCCHI, M.; D'ALESSIO, G.; LEONE, E. Pyridine-nucleotide coenzymes in bull and rabbit spermatozoa. **Journal of reproduction and fertility**. v. 16, n. 2, p. 223-231, 1968.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**. v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.
- BROOKS, D. E.; MANN, T. Relation between the oxidation state of nicotinamide-adenine dinucleotide and the metabolism of spermatozoa. **The Biochemical journal**. v. 129, n. 5, p. 1023-1034, 1972.
- CARVAJAL, G.; CUELLO, C.; RUIZ, M.; VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A.; ROCA, J. Effect of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. **Journal of Andrology**. v. 25, p. 389–396, 2004.
- 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. 930–948, 2009.
- CASAS, I.; SANCHO, S.; BALLESTER, J.; BRIZ, M.; PINART, E.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; FÀBREGA, A.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; BONET, S. The HSP90AA1 sperm content and the prediction of the boar ejaculate freezability. **Theriogenology**. v. 74, n. 6, p. 940-950, 2010.

ČEŘOVSKÝ, J.; FRYDRYCHOVÁ, S.; LUSTYKOVÁ, A.; LIPENSKÝ, J.; ROZKOT, M. Semen characteristics of boars receiving control diet and control diet supplemented with L-carnitine. **Czech Journal of Animal Science**. v. 54, n. 9, p. 417-425, 2009.

DÍAZ, R.; TORRES, M. A.; PAZ, E.; QUIÑONES, J.; BRAVO, S.; FARÍAS, J. G.; SEPÚLVEDA, N. Dietary inclusion of fish oil changes the semen lipid composition but does not improve the post-thaw semen quality of ram spermatozoal. **Animal Reproduction Science**. v. 183, p. 132–142, 2017.

DIETRICH, M. A.; NYNCA, J.; CIERESZKO, A. Proteomic and metabolomic insights into the functions of the male reproductive system in fishes. **Theriogenology**. v. 132, p. 182-200, 2019.

DIPRESA, S.; DE TONI, L.; FORESTA, C.; GAROLLA, A. New markers for predicting fertility of the male gametes in the post genomic age. **Protein & Peptide Letters publishes letters**. v. 25, n. 5, p. 434–439, 2018.

DOMINO, S. E.; GARBERS, D. L. Stimulation of phospholipid turnover in isolated sea urchin sperm heads by the fucose-sulfate glycoconjugate that induces an acrosome reaction. **Biology of Reproduction**. v. 41, p. 133–141, 1989.

D'OCCHIO, M. J.; BARUSELLI, P. S.; CAMPANILE, G. Metabolic health, the metabolome and reproduction in female cattle: a review. **Italian Journal of Animal Science**. v. 18, n. 1, p. 858-867, 2019.

ENGEL, K. M.; BAUMANN, S.; ROLLE-KAMPCZYK, U.; SCHILLER, J.; BERGEN, M. V.; GRUNEWALD, S. Metabolomic profiling reveals correlations between spermogram parameters and the metabolites present in human spermatozoa and seminal plasma. **PLoS ONE**. v. 14, n. 2, p. e0211679, 2019.

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

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

FU, L.; LIU, Y.; AN, Q.; ZHANG, J.; TONG, Y.; ZHOU, F.; LU, W. Glycolysis metabolic changes in sperm cryopreservation based on a targeted metabolomic strategy. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**. v. 12, n. 5, p. 1775-1781, 2019.

GYGI, S. P.; ROCHON, Y.; FRANZA, B. R.; AEBERSOLD, R. Gene expression: Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Molecular Cell Biology**, v. 19, p. 1720 – 1730, 1999.

GROMSKI, P. S.; MUHAMADALI, H.; ELLIS, D. I.; XU, Y.; CORREA, E.; TURNER, M. L.; GOODACRE, R. A tutorial review: metabolomics and partial least squares-discriminant analysis--a marriage of convenience or a shotgun wedding. **Analytica Chimica Acta**. v. 879, p. 10–23, 2015.

GUIJAS, C.; MONTENEGRO-BURKE, J. R.; WARTH, B.; SPILKER, M. E.; SIUZDAK, G. Metabolomics activity screening for identifying metabolites that modulate phenotype. **Nature Biotechnology**. v. 36, n. 4, p. 316–320, 2018.

HOLDEN SA, FERNANDEZ-FUERTE B, MURPHY C, WHELAN H, O’GORMAN A, BRENNAN L, BUTLER ST, LONERGAN P, FAIR S. Relationship between in vitro sperm functional assessments, seminal plasma composition, and field fertility after AI with either non-sorted or sex-sorted bull semen. **Theriogenology**. v. 87, p. 221-228, 2017.

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, p. 370–382, 2005.

JONES, A. R.; BUBB, W. A. Substrates for endogenous metabolism by mature boar spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 119, p. 129-135, 2000.

KUMAR, A.; KROETSCH, T.; BLONDIN, P.; ANZAR, M. Fertility-associated metabolites in bull seminal plasma and blood serum: ¹H nuclear magnetic resonance analysis. **Molecular Reproduction and Development**. n. 82, v. 2, p. 123-131, 2015.

KURZ, A.; VIERTEL, D.; HERRMANN, A.; MULLER, K. Localization of phosphatidylserine in boar sperm cell membranes during capacitation and acrosome reaction. **Reproduction**. v. 130, p. 615-626, 2005.

LAFFALDANO, N.; DI IORIO, M.; MANNINA, L.; PAVENTI, G.; ROSATO, M. P.; CEROLINI, S.; SOBOLEV, A. P. Age-dependent changes in metabolic profile of Turkey spermatozoa as assessed by NMR analysis. **PLoS ONE**. v. 13, n. 3, p. e0194219, 2018.

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.

LI, J.; ROCA, J.; PÉREZ-PATIÑO, C.; BARRANCO, I.; MARTINEZ, E. A. Is boar sperm freezability more intrinsically linked to spermatozoa than to the surrounding seminal plasma? **Animal Reproduction Science**. v. 195, n. April, p. 30 – 37, 2018.

LIN, C.; HUNG, P.; VANDEVOORT, C. A.; MILLER, M. G. ¹H NMR to investigate metabolism and energy supply in rhesus macaque sperm. **Reproductive toxicology**. v. 28, n. 1, p. 75-80, 2009.

MA, P.; ZHANG, Z.; ZHOU, X.; LUO, J.; LU, H.; WANG, Y. Characterizing semen abnormality male infertility using non-targeted blood plasma metabolomics. **PLoS ONE**. v. 14, n. 7, p. e0219179, 2019.

MARIN, S.; CHIANG, K.; BASSILIAN, S.; LEE, W. N.; BOROS, L. G.; FERNANDEZ-NOVELL, J. M.; CENTELLES, J. J.; MEDRANO, A.; RODRIGUEZ-GIL, J. E.; CASCANTE M. Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. **FEBS Letters**. v. 554, n. 3, p. 342–346, 2003.

MEDRANO, A.; HOLT, W. V.; WATSON, P.F. Controlled freezing studies on boar sperm cryopreservation. **Andrologia**. v. 41, n. 4, p. 246–250, 2009.

MENEZES, E. B.; VELHO, A. L. C.; SANTOS, F.; DINH, T.; KAYA, A.; TOPPER, E.; MOURA, A. A.; MEMILI, E. Uncovering sperm metabolome to discover biomarkers for bull fertility. v. 20, n.714, p. 1-16, 2019.

NAZ, R. K.; KAPLAN, P.; BADAMCHIAN, M.; GOLDSTEIN, A. L. Effects of synthetic thymosin- α 1 and its analogs on fertilizability of human sperm: Search for a biologically active, stable epitope. **Systems Biology in Reproductive Medicine**. v. 35, n. 1, p. 63-69, 1995.

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

NELSON, D. L.; COX, M. M. Glycolysis, gluconeogenesis, and the pentose phosphate pathway. In: NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 6th ed. Basingstoke: Macmillan Education, 2013. p. 521-559, Cap 14.

NILCHOLSON, J. K.; LINDON, J. C.; HOLMES, E. “Metabolomics”: understanding the metabolic response of living systems to pathological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. **Xenobiotica**. v. 29, n. 11, p. 1181-1189, 1999.

PAIVA, C.; AMARAL, A.; RODRIGUEZ, M.; CANYELLAS, N.; CORREIG, X.; BALLESCÀ, J. L.; RAMALHO-SANTOS, J.; OLIVA, R. Identification of endogenous metabolites in human sperm cells using proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Andrology**. v. 3, n. 3, p. 496-505, 2015.

PATEL, A. B.; SRIVASTAVA, S.; PHADKE, R. S.; GOVIL, G. Arginine activates glycolysis of goat epididymal spermatozoa: an NMR study. **Biophysical Journal**. v. 75, n. 3, p. 1522–1528, 1998.

PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v. 13, n. 4, p. 263-269, 2012.

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

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

- POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v. 22, p. 87–95, 1991.
- RAHIMI, R.; FARAHMAND, H.; MIRVAGHEFI, A.; RAFIEE, G.; ABED-ELMDOUST, A. ¹H NMR metabolic profiling of the cryopreserved spermatozoa of the wild endangered Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) with the use of beta-cyclodextrin as an external cryoprotectant. **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 45, n. 3, p. 1029-1040, 2019.
- ROCA, J.; HERNÁNDEZ, M.; CARVAJAL, G.; VÁZQUEZ, J. M.; MARTÍNEZ, E. A. Factors influencing boar sperm cryosurvival. **Journal of Animal Science**. v. 84, p. 2692–2699, 2006.
- ROCA, J.; PARRILLA, I.; BOLARIN, A.; MARTINEZ, E. A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Will AI in pigs become more efficient? **Theriogenology**. v. 88, p. 187–193, 2016.
- Saravia, F. **Cryopreservation of boar semen: impact of the use of specific ejaculate portions, concentrated packaging, and simplified freezing procedures on sperm cryosurvival and potential fertilizing**. 63f. Doctoral thesis - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2008.
- REYNOLDS, S.; CALVERT, S. J.; PALEY, M. N.; PACEY, A. A. ¹H Magnetic Resonance Spectroscopy of live human sperm. **Molecular Human Reproduction**. v. 23, n. 7, p. 441-451, 2017.
- ROLDAN, E. R. S.; HARRISON, R. A. P. Diacylglycerol and phosphatidate production and the exocytosis of the sperm acrosome. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 172, p. 8–15, 1990.
- ROLDAN, E. R. S.; HARRISON, R. A. P. The role of diacylglycerol in the exocytosis of the sperm acrosome. Studies using diacylglycerol lipase and diacylglycerol kinase inhibitors and exogenous diacylglycerols. **Biophysical Journal**. v. 281, p. 767–773, 1992.
- SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. Plant metabolomics: Large- scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**. v. 62, p. 817 – 836, 2003.

- THURSTON, L. M.; SIGGINS, K.; MILEHAM, A. J.; WATSON, P. F.; HOLT, W. V. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. **Biology of reproduction**. v. 66, p. 545-554, 2002.
- TORRES, M. A.; MONTEIRO, M. S.; PASSARELLI, M. S.; PAPA, F. O.; DELL' AQUA Jr, J.A.; ALVRENGA, M. A.; MARTINS, S. M. M. K.; ANDRADE, A. F. C. 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.
- VALENCIA, J.; GÓMEZ, G.; LÓPEZ, W.; MESA, H.; HENAO, F. J. Relationship between HSP90a, NPC2 and L-PGDS proteins to boar semen freezability. **Journal of Animal Science and Biotechnology**. v. 8, n. 1, p. 8-21, 2017
- VELHO, A. L. C.; MENEZES, E.; DINH, T.; KAYA, A.; TOPPER, E.; MOURA, A. A.; MEMILI, E. Metabolomic markers of fertility in bull seminal plasma. **PLoS ONE**. v. 13, n. 4, p. e0195279, 2018.
- VILAGRAN, I.; CASTILLO, J.; BONET, S.; SANCHO, S.; YESTE, M.; ESTANYOL, 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, 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, n. 3, p. 418-426, 2014.
- VILAGRAN, I.; YESTE, M.; SANCHO, S.; CASTILLO, J.; OLIVA, 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. 345-356, 2015.
- VILLAS-BÔAS, S. G.; GOMBERT, A. K. Análise do Metaboloma: Uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós-genômica. **Biociência**. v. 36, p. 58-69, 2006.

WANG, Y. X.; WU, Y.; CHEN, H. G.; DUAN, P.; WANG, L.; SHEN, H. Q.; LU, W. Q.; SUN, B.; WANG, Q.; ZHANG, B.; CHAVARRO, J. E.; ZHANG, J.; PAN, A. Seminal plasma metabolome in relation to semen quality and urinary phthalate metabolites among Chinese adult men. **Environment International**. n. 129, v. May, p. 354-363, 2019.

WATSON, P. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 31, n. 1, p. 135-140, 1996.

YAKU, K.; OKABE, K.; GULSHAN, M.; TAKATSU, K.; OKAMOTO, H.; NAKAGAWA, T. Metabolism and biochemical properties of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) analogs, nicotinamide guanine dinucleotide (NGD) and nicotinamide. **Scientific Reports**. v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.

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, n. 6, p. 929-939, 2013.

YESTE, M.; ESTRADA, E.; RIVERA DEL ÁLAMO, M. M.; BONET, S. T.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. The increase in phosphorylation levels of serine residues of protein HSP70 during holding time at 17°C is concomitant with a higher cryotolerance of boar spermatozoa. **PLoS One**. v. 9, p. 1–19, 2014.

YESTE, M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. **Theriogenology**. v. 85, n. 1, p. 47-64, 2016.

ZHANG, X.; DIAO, R.; ZHU, X.; LI, Z.; CAI, Z. Metabolic characterization of asthenozoospermia using nontargeted seminal plasma metabolomics. **Clinica Chimica Acta**. v. 450, p. 254-261, 2015.

ZHAO, K.; ZHANG, J.; XU, Z.; XU, Y.; XU, A.; CHEN, W.; MIAO, C.; LIU, S.; WANG, Z.; JIA, R. Metabolomic Profiling of Human Spermatozoa in Idiopathic Asthenozoospermia Patients Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **BioMed Research International**. v. 2018, Article ID 8327506.

7 CONCLUSÕES

1. A criotolerância dos espermatozoides suínos aumenta com o aumento do *holding time* pré-criopreservação até atingir sua eficiência máxima.
2. O uso de tempos de manutenção maiores que o gera eficiência máxima, não reduz a criotolerância dos espermatozoides suínos.
3. O uso do *holding time* nos protocolos de criopreservação do sêmen suíno altera a congelabilidade do ejaculado.
4. A assinatura metabólica da influência do uso de *holding time* no espermatozoide suíno conservado à 17 °C antes da criopreservação é capaz de explicar as diferenças observadas entre os grupos de congelabilidade.
5. A assinatura metabólica da influência do uso de *holding time* no plasma seminal suíno da amostra conservada à 17 °C antes da criopreservação é capaz de explicar as diferenças observadas entre o uso ou não de HT no protocolo de congelação.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ O estudo do tempo ideal de HT foi realizado em um protocolo de criopreservação com duas etapas de diluição/ diminuição de temperatura, a saber: 1) BTS – temperatura ambiente para 17 °C; 2) diluente à base de gema de ovo-lactose acrescido de crioprotetores – temperatura de 17 °C à congelado (-196 °C).
- ✓ As alterações de abundância de alguns metabolitos nos espermatozoides suínos são decorrentes das diferenças de congelabilidade inerentes ao ejaculado; enquanto as alterações na abundância dos metabólitos do plasma seminal são decorrentes das diferenças intrínsecas ao HT.
- ✓ A interação das origens das diferenças dos metabólitos pode ser responsável por explicar os resultados de interação observados na fisiologia dos espermatozoides descongelados

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

✓ Futuros experimentos podem ser realizados com as moléculas que foram identificadas, nesse trabalho, como marcadores biológicos de alta congelabilidade. Essas moléculas podem ser sintetizadas *in vitro* e adicionadas a ejaculados considerados de baixa congelabilidade, com objetivo de aumentar a congelabilidade desses ejaculados.

✓ Com objetivo de diminuir o tempo de congelação do sêmen suíno, futuros experimentos podem ser realizados com as moléculas que foram identificadas em ejaculados que passaram pelo processo de *holding time*. Essas moléculas podem ser sintetizadas *in vitro* e adicionadas aos ejaculados imediatamente após a coleta, e com isso o sêmen seria criopreservado sem o uso de *holding time*.

✓ Essas alternativas podem auxiliar as empresas de genética, que fazem maior uso do sêmen criopreservado de suíno, a importarem e exportarem genética; aumentando o ganho genético do rebanho.

REFERÊNCIAS

- ALMLID, T.; STAVNE, S. E.; JOHNSON, L. A. Fertility evaluation of the straw freezing technique for boar semen under practical AI conditions. **Zuchthygiene (Berl.)** v. 22, p. 193, 1987.
- AURICH, J. E.; KÜHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**. v. 46, n. 5, p. 791–797, 1996.
- BAILEY, J. L.; LESSARD, C.; JACQUES, J.; BRÈQUE, C.; DOBRINSKI, I.; ZENG, W.; GALANTINOHOMER, H. L. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. **Theriogenology**. v. 70, n. 8, p. 1251–1259, 2008.
- BAISHYA, 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.
- BARRANCO, I.; RUBÉR, M.; PEREZ-PATIÑO, C.; ATIKUZZAMAN, M.; MARTINEZ, E. A.; ROCA, J.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. The seminal plasma of the boar is rich in cytokines, with significant individual and intra-ejaculate variation. **American Journal of Reproductive Immunology**. n. September, p. 1-10, 2015.
- BIENIEK, J. M.; DRABOVICH, A. P.; LO, K. C. Seminal biomarkers for the evaluation of male infertility. **Asian Journal of Andrology**. v. 18, n. 3, p. 426–433, 2016
- CARVAJAL, G.; CUELLO, C.; RUIZ, M.; VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A.; ROCA, J. Effect of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. **Journal of Andrology**. v. 25, p. 389–396, 2004.
- 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. 930–948, 2009.
- CASAS, I.; SANCHO, S.; BALLESTER, J.; BRIZ, M.; PINART, E.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; FÀBREGA, A.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; BONET, S. The HSP90AA1 sperm

content and the prediction of the boar ejaculate freezability. **Theriogenology**. v. 74, n. 6, p. 940-950, 2010.

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, P. 69–75, 2013.

DIETRICH, M. A.; NYNCA, J.; CIERESZKO, A. Proteomic and metabolomic insights into the functions of the male reproductive system in fishes. **Theriogenology**. v. 132, p. 182-200, 2019.

D'OCCHIO, M. J.; BARUSELLI, P. S.; CAMPANILE, G. Metabolic health, the metabolome and reproduction in female cattle: a review. **Italian Journal of Animal Science**. v. 18, n. 1, p. 858-867, 2019.

ENGEL, K. M.; BAUMANN, S.; ROLLE-KAMPCZYK, U.; SCHILLER, J.; BERGEN, M. V.; GRUNEWALD, S. Metabolomic profiling reveals correlations between spermiogram parameters and the metabolites present in human spermatozoa and seminal plasma. **PLoS ONE**.v. 14, n. 2, p. e0211679, 2019.

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

FU, L.; LIU, Y.; AN, Q.; ZHANG, J.; TONG, Y.; ZHOU, F.; LU, W. Glycolysis metabolic changes in sperm cryopreservation based on a targeted metabolomic strategy. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**. v. 12, n. 5, p. 1775-1781, 2019.

GALE, I.; GIL, L.; MALO, C.; GONZÁLEZ, N.; MARTÍNEZ, F. Effect of *Camellia sinensis* supplementation and increasing holding time on quality of cryopreserved boar semen. **Andrologia**. v. 47, p. 505–512, 2014.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozoide e plasma seminal. In: HAFEZ E. S. E. **Reprodução Animal**. 7. Barueri: Manole Ltda, 2004. pp. 97–110, Cap.7.

GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. **Theriogenology**. v. 63, p. 396–410, 2005.

HERNÁNDEZ, M.; ROCA, J.; BALLESTER, J.; VÁZQUEZ, J. M.; MARTÍNEZ, E. A.; JOHANNISSON, A.; SARA VIA, F.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Differences in SCSA outcome among boars with different sperm freezability. **International Journal of Andrology**. v. 29, n. 6, p. 583–591, 2006.

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, p. 370–382, 2005.

HUNG, P.; FROENICKE, L.; YU, C.; LYONS, L.A.; MILLER, M.G.; PINKERTON, K.E.; VANDEVOORT, C. Effects of environmental tobacco smoke in vivo on rhesus monkey semen quality, sperm function, and sperm metabolism. **Reproductive Toxicology**. v. 27, p. 140-148, 2009.

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

JONES, A. R.; BUBB, W. A. Substrates for endogenous metabolism by mature boar spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 119, p. 129-135, 2000.

JUYENA, N. S.; STELLETTA, C. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. **Journal of Andrology**. v. 33, p. 536–551, 2012.

KUMAR, A.; KROETSCH, T.; BLONDIN, P.; ANZAR, M. Fertility-associated metabolites in bull seminal plasma and blood serum: ¹H nuclear magnetic resonance analysis. **Molecular Reproduction and Development**. n. 82, v. 2, p. 123-131, 2015.

LAFFALDANO, N.; DI IORIO, M.; MANNINA, L.; PAVENTI, G.; ROSATO, M. P.; CEROLINI, S.; SOBOLEV, A. P. Age-dependent changes in metabolic profile of Turkey spermatozoa as assessed by NMR analysis. **PLoS ONE**. v. 13, n. 3, p. e0194219, 2018.

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.

LI, J.; ROCA, J.; PÉREZ-PATIÑO, C.; BARRANCO, I.; MARTINEZ, E. A. Is boar sperm freezability more intrinsically linked to spermatozoa than to the surrounding seminal plasma? **Animal Reproduction Science**. v. 195, n. April, p. 30 – 37, 2018.

LIN, C.; HUNG, P.; VANDEVOORT, C. A.; MILLER, M. G. ¹H NMR to investigate metabolism and energy supply in rhesus macaque sperm. **Reproductive toxicology**. v. 28, n. 1, p. 75-80, 2009.

MA, P.; ZHANG, Z.; ZHOU, X.; LUO, J.; LU, H.; WANG, Y. Characterizing semen abnormality male infertility using non-targeted blood plasma metabolomics. **PLoS ONE**. v. 14, n. 7, p. e0219179, 2019.

MARIN, S.; CHIANG, K.; BASSILIAN, S.; LEE, W. N.; BOROS, L. G.; FERNANDEZ-NOVELL, J. M.; CENTELLES, J. J.; MEDRANO, A.; RODRIGUEZ-GIL, J. E.; CASCANTE M. Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. **FEBS Letters**. v. 554, n. 3, p. 342–346, 2003.

MEDRANO, A.; HOLT, W. V.; WATSON, P.F. Controlled freezing studies on boar sperm cryopreservation. **Andrologia**. v. 41, n. 4, p. 246–250, 2009.

MENEZES, E. B.; VELHO, A. L. C.; SANTOS, F.; DINH, T.; KAYA, A.; TOPPER, E.; MOURA, A. A.; MEMILI, E. Uncovering sperm metabolome to discover biomarkers for bull fertility. v. 20, n.714, p. 1-16, 2019.

PAIVA, C.; AMARAL, A.; RODRIGUEZ, M.; CANYELLAS, N.; CORREIG, X.; BALLESCÀ, J. L.; RAMALHO-SANTOS, J.; OLIVA, R. Identification of endogenous metabolites in human sperm cells using proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Andrology**. v. 3, n. 3, p. 496-505, 2015.

PATEL, A. B.; SRIVASTAVA, S.; PHADKE, R. S.; GOVIL, G. Arginine activates glycolysis of goat epididymal spermatozoa: an NMR study. **Biophysical Journal**. v. 75, n. 3, p. 1522–1528, 1998.

PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v. 13, n. 4, p. 263-269, 2012.

PURSEL, V. G.; SCHULMAN, L.; JOHNSON, L. A. Effect of holding time on storage of boar spermatozoa at 5° C. **Journal Animal Science**. v. 37, p. 785–789, 1973.

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

RAHIMI, R.; FARAHMAND, H.; MIRVAGHEFI, A.; RAFIEE, G.; ABED-ELMDOUST, A. ¹H NMR metabolic profiling of the cryopreserved spermatozoa of the wild endangered Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) with the use of beta-cyclodextrin as an external cryoprotectant. **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 45, n. 3, p. 1029-1040, 2019.

REYNOLDS, S.; CALVERT, S. J.; PALEY, M. N.; PACEY, A. A. ¹H Magnetic Resonance Spectroscopy of live human sperm. **Molecular Human Reproduction**. v. 23, n. 7, p. 441-451, 2017.

ROCA, J.; HERNÁNDEZ, M.; CARVAJAL, G.; VÁZQUEZ, J. M.; MARTÍNEZ, E. A. Factors influencing boar sperm cryosurvival. **Journal of Animal Science**. v. 84, p. 2692–2699, 2006.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; KVIST, U.; ERNERUDH, J.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. Seminal plasma proteins: what role do they play? **American Journal of Reproductive Immunology**. v. 66, p. 11–22, 2011.

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.

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

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, p. 115–121, 2014.

TORRES, M. A.; DÍAZ, R.; BOGUEN, R. MARTINS, S. M. M. K.; RAVAGNANI, G. M.; LEAL, D. F.; OLIVEIRA, M. L.; MURO, B. B. D.; PARRA, B. M.; MEIRELLES, F. V.; PAPA, F. O.; DELL'AQUA JR., J. A.; ALVARENGA, M. A.; MORETTI, A. S.; SEPÚLVEDA, N.; ANDRADE, A. F. C. Novel flow cytometry analyses of boar sperm viability: can the addition of whole sperm-rich fraction seminal plasma to frozen-thawed boar sperm affect it? **PLoS One**. v. 1, p. e0160988, 2016a.

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

VALENCIA, J.; GÓMEZ, G.; LÓPEZ, W.; MESA, H.; HENAO, F.J. Relationship between HSP90a, NPC2 and L-PGDS proteins to boar semen freezability. **Journal of Animal Science and Biotechnology**. v. 8, n. 1, p. 8-21, 2017

VELHO, A. L. C.; MENEZES, E.; DINH, T.; KAYA, A.; TOPPER, E.; MOURA, A. A.; MEMILI, E. Metabolomic markers of fertility in bull seminal plasma. **PLoS ONE**. v. 13, n. 4, p. e0195279, 2018.

VILAGRAN, I.; CASTILLO, J.; BONET, S.; SANCHO, S.; YESTE, M.; ESTANYOL, 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, 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, n. 3, p. 418-426, 2014.

VILAGRAN, I.; YESTE, M.; SANCHO, S.; CASTILLO, J.; OLIVA, 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. 345-356, 2015.

WANG, Y. X.; WU, Y.; CHEN, H. G.; DUAN, P.; WANG, L.; SHEN, H. Q.; LU, W. Q.; SUN, B.; WANG, Q.; ZHANG, B.; CHAVARRO, J. E.; ZHANG, J.; PAN, A. Seminal plasma metabolome in relation to semen quality and urinary phthalate metabolites among Chinese adult men. **Environment International**. n. 129, v. May, p. 354-363, 2019

WASILEWSKA, K.; FRASER, L. Boar variability in sperm cryo-tolerance after cooling of semen in different long-term extenders at various temperatures. **Animal Reproduction Science**. v. 185, p. 161–173, 2017.

WATSON, P. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 31, n. 1, p. 135-140, 1996.

WESTENDORF, P.; RICHTER, L.; TREU, H. Zur Tiefgefrierung von ebersperma labor-und besamungsergebnisse mit dem hulsenberger pailletten-verfahren. **Dtsch. Tierartzl. Wschrr.** v. 82, p. 61-267, 1975.

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, n. 6, p. 929-939, 2013.

YESTE, M.; ESTRADA, E.; RIVERA DEL ÁLAMO, M. M.; BONET, S. T.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. The increase in phosphorylation levels of serine residues of protein HSP70 during holding time at 17°C is concomitant with a higher cryotolerance of boar spermatozoa. **PLoS One**. v. 9, p. 1–19, 2014.

YESTE, M. Recent Advances in boar sperm cryopreservation: state of the art and current perspectives. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 50, n. 2, p. 71–79, 2015.

YESTE, M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. **Theriogenology**. v. 85, n. 1, p. 47-64, 2016.

ZHAO, K.; ZHANG, J.; XU, Z.; XU, Y.; XU, A.; CHEN, W.; MIAO, C.; LIU, S.; WANG, Z.; JIA, R. Metabolomic Profiling of Human Spermatozoa in Idiopathic Asthenozoospermia Patients Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **BioMed Research International**. v. 2018, Article ID 8327506.

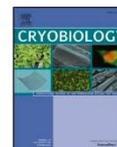
APÊNDICE A – ARTIGO I PUBLICADO

Cryobiology 86 (2019) 58–64



Contents lists available at ScienceDirect

Cryobiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cryo

The ideal holding time for boar semen is 24 h at 17 °C prior to short-cryopreservation protocols

Mariana A. Torres^a, Matheus S. Monteiro^a, Marina S. Passarelli^a, Frederico O. Papa^b, José Antônio Dell'Aqua Jr.^b, Marco Antônio Alvarenga^b, Simone M.M.K. Martins^a, André F.C. de Andrade^{a,*}

^a Swine research center, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, Pirassununga, SP, Brazil

^b Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Swine
Spermatozoa
Cryopreservation
Cooling
Membrane integrity

ABSTRACT

Boar semen cannot be immediately cryopreserved, it need be hold at 17 °C prior to cryopreservation, holding time has been used to improve cryopreserved boar semen, since holding time allows a prolonged interaction between spermatozoa and seminal plasma components. However, until now only few periods of holding time have been studied, and boar semen had been held at 17 °C for 24 h to facilitate its manufacture. Thus, this experiment aims to study the effect several holding time (0, 4, 8, 12, 24, 28 and 32 h) on boar spermatozoa post-thawed (PT) characteristics. Fifteen sperm-rich fractions of ejaculate were extended in Beltsville Thawing Solution and storage at 17 °C. After each holding time (0, 4, 8, 12, 24, 28 and 32 h), a sample was centrifuged, and sperm pellet was diluted in an extender composed of sugars, amino acids, buffers, 20% egg yolk (v/v), antibiotics, 2% glycerol as a cryoprotectant, and 2% methylformamide (v/v). Cryopreservation was performed with an automatic cryopreservation system. Cryopreserved boar semen was evaluated to spermatozoa kinetics, plasma and acrosomal membranes integrity, mitochondrial membrane potential, detection of superoxide anion, plasma membrane fluidity, and peroxidation. Twenty-four hours of holding increase total and progressive motility, rapid spermatozoa, and integrity of plasma and acrosome membranes. To mitochondrial membrane potential, 32 h is needed. However, holding time was not able to control the superoxide anion amount neither membrane lipid peroxidation, and had no effects on membrane fluidity. Thus, to reach the best results of PT boar semen the ideal holding time is 24 h.

1. Introduction

The first boar semen cryopreservation, in pellets, dates from 1975 made by Pursel and Johnson [37]; however, the actual cryopreservation methods with “maxi” (5 mL) and “mini” straws have been used for almost 30 years [20]. Despite the use of cryopreserved boar semen not be recent, it is not used on large scale [55]. It is due to the damages on the plasma membrane and acrosome and reduces sperm motility [37,42,55], but also to the complexity in handling cryopreservation and thawing procedures [42]. The simplification of those procedures could increase its use [42]. Short-cryopreservation protocol is routinely used to cryopreserve bull, ram and equine semen [1,12,24] and have been recently used to cryopreserve boar spermatozoa [38,46,51,52]. However, boar spermatozoa seem to be more sensitive to the toxicity of glycerol on high temperatures compared to bull, ram and equine

spermatozoa. Thus, the incorporation of holding time on this simple protocol could be an alternative to improve the post-thawed (PT) sperm quality parameters.

Cryopreservation facilities are normally far from pig farm; thus, semen must be delivered for cryopreservation. For it, semen is diluted in a cooling extender (like BTS - Beltsville Thawing Solution) and hold at 15–17 °C [50]. This period is generic named ‘holding time’, and besides facilitating boar semen cryopreservation, it is also described that increases spermatozoa cryotolerance [8,14,16,50,54]. Although it is known that boar spermatozoa need at least 3 h of holding time [54], and it is usually hold for 24 h to facilitate its manufacture, the ideal holding time that ensure the best cryopreservation results remain unknown.

Seminal plasma components participate in several physiologic pathways, such as the activation of spermatozoa motility,

* Corresponding author.

E-mail address: andrefc@usp.br (A.F.C. de Andrade).

<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.12.004>

Received 25 August 2018; Received in revised form 20 November 2018; Accepted 13 December 2018

Available online 14 December 2018

0011-2240/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

antioxidation, stabilization of plasma and acrosomal membranes, regulation of mitochondrial metabolism, protection against proteases inhibitors and cold-shock protection [21,33,34,54]. However, the cervix holds the seminal plasma, preventing it from reaching far away female reproductive organs [17]. Holding time is described as responsible to increase spermatozoa cryotolerance [50,53,54]. This effect is possible due the extended interaction between seminal plasma components and spermatozoa plasma membrane during holding time [26]. With its seminal plasma components could be attached on sperm plasma membrane [28] (during holding) and be carried to distant parts of the female reproductive tract, and then exert their actions.

It is well known that the use of holding time prior to cryopreservation improves PT boar spermatozoa quality. However, until now the studies in the literature had performed only assays with few holding time periods per experiment using long-cryopreservation protocol (i.e. 3, 10 and 20 h [14]; 0 and 24 h [8]; 2 and 24 [16]; 2, 8 and 24 h [50]; 3 and 24 h [54]). Beyond the bounds, the present study brings to the literature a holding time study with seven evaluated times of holding boar semen at 17 °C previous to short-cryopreservation protocol. So, as previous elucidated, this study aims to describe the effects of several holding time periods (0, 4, 8, 12, 24, 28 and 32 h) on cryopreserved boar spermatozoa. Specifically, the effects on spermatozoa kinetics, plasma and acrosomal membranes integrity, mitochondrial membrane potential, detection of superoxide anion, plasma membrane fluidity and peroxidation.

2. Material and methods

The Ethics Committee for the use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo had approved this experiment under protocol 5664140316. All animal procedures performed according to the legal and ethical standards.

2.1. Experimental design

The experimental design is shown in Fig. 1. The experiment was designed as a randomized block (each boar was considered a block), and the experimental units were 1/7 of boar ejaculate sperm-rich fraction. This study was designed to compare seven different times of hold boar semen at 17 °C prior to cryopreservation. Samples for this assay were from five boars, each sample were split for the seven holding time, and cryopreserved individually in three trials. Two straws were used to evaluate the CASA parameters, and other two straws to flow cytometry analysis.

2.2. Reagents and chemicals

The medium Botu-Sui[®] (composed of sugars, amino acids, buffers, 20% egg yolk [v/v], antibiotics, 2% glycerol as a cryoprotectant, and 2% methylformamide [v/v]) was developed and donated by Biotech-Botucatu-Ltda/ME (Botucatu, SP, Brazil). Beltsville Thawing Solution (BTS) was acquired from IMV Technologies (L'Aigle, France). The fluorescent probes Syto 59 (S59), C11-BODIPY581/591 (BP), Yo-Pro-1 (YP), dihydroethidium (DHE), JC-1 and Merocyanine 540 (M540) were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). Unless otherwise stated, all other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

2.3. Incubation media

Semen samples were diluted in Tyrode's albumin lactate pyruvate (TALP) sperm medium [3]. The medium pH was adjusted to 7.4 using 5 N NaOH. During staining, TALP medium was maintained at 37 °C in a water bath.

2.4. Semen collection, raw semen evaluation, and the simplified protocol to cryopreservation boar semen

Three sperm-rich fraction (SRF) of ejaculate was obtained from each of five boars ($n = 15$) by the gloved-hand technique. Immediately after collection, each semen sample was held at room temperature (20–22 °C) in its own seminal plasma, without dilution, for 30 min [36,44]. Raw semen was evaluated to volume, spermatozoa concentration (Neubauer chamber), spermatozoa kinetics (computer-assisted sperm analysis – SCA, Microptics[®] - Barcelona/Spain) and morphology (differential interference contrast microscopy – DIC). After raw semen evaluation, it was extended 1:2 (v:v) in BTS, aliquoted in seven treatments (periods of holding time 0, 4, 8, 12, 24, 28 and 32 h) and cooled at 17 °C. After each holding time, extended semen was centrifuged under 2200 × g for 3 min [7] and the supernatant was separated from the pellet by aspiration. Spermatozoa pellet was suspended with freezing extender to obtain a final concentration of 600×10^6 spermatozoa/mL [40] and stored in 0.5 mL straws (IMV Technologies, Laigle, France). Straws were subsequently cryopreserved with a short-cryopreservation protocol according Torres et al. [51,52] using an automatic freezing system (TK 3000; TK Tecnologia em Congelamento Ltda, Uberaba, Brazil) and cooled at a rate of -0.5 °C/min to 5 °C. The freezing rate used was -20 °C/min from 5 to -120 °C. Subsequently, the straws were immersed into liquid nitrogen at -196 °C. All straws were kept in liquid nitrogen for a minimum of 1 wk before thawing.

2.5. Semen thawing

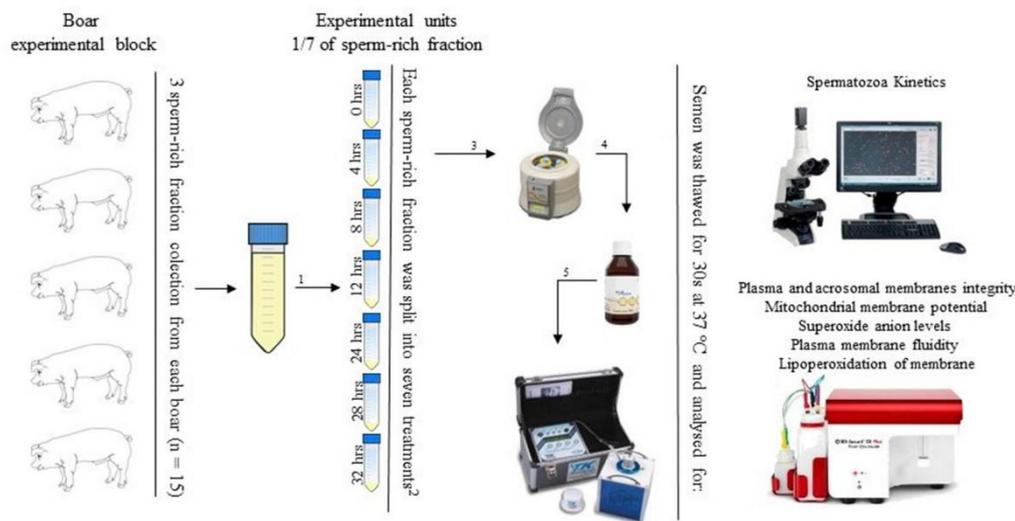
Two straws per ejaculate and time of holding were thawed in a water bath at 37 °C for 30 s thawed semen was directly diluted in BTS (1:2; v: v). Additionally, to thawed analysis diluted samples was extended another time to archive the ideal spermatozoa concentration for each sperm analysis. Computer-assisted semen analysis was performed after samples dilution in BTS to 50×10^6 spermatozoa/mL. Flow cytometer analysis was performed after semen dilution in TALP to 5×10^6 spermatozoa/mL.

2.6. Computer-assisted sperm analysis (CASA)

A sample aliquot (5 µL) was placed on a pre-warmed Makler chamber and evaluated by phase-contrast microscopy (Nikon, Model Eclipse 80i) with 100x magnification. Five good fields were examine using SCA (Microptics[®] - Barcelona/Spain) for evaluating the following parameters: total (TM) and progressive (PM) motility, rapid spermatozoa (RAPID), curvilinear velocity (VCL), straight-line velocity (VSL), average path velocity (VAP), linearity (LIN), straightness (STR), amplitude of lateral head displacement (ALH), beat cross frequency (BCF) and hypermotility (HYPER). We evaluated the spermatozoa hyperactivated (ALH > 3.5 µm and VCL > 97 µm/s) using Edit/Sort in the software [45].

2.7. Flow cytometry assays

Flow cytometry analysis were performed with Accuri C6 flow cytometer (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA). All assays were performed according the modifications made by Díaz et al., [12]. Samples were staining with S59 (5 nM in 150 µL at 5×10^6 spermatozoa/mL; band pass filter of 675/25 nm) for 10 min at 37 °C. S59 is a dye-permeable membrane cell to stain the DNA of the sperm cells. Therefore, particles with the same size and scatter properties as spermatozoa were not counted as spermatozoa [12,51]. The spectral overlap of the staining in the flow cytometer analyses was compensated whenever necessary. The samples were processed through the instrument at an acquisition rate of approximately 600 to 1000 events/s, acquiring 10,000 S59 positive events per assay. The cells were simultaneously excited by an argon laser at 488 nm and by a red laser at



¹After collection semen was maintained for 30 min at room temperature, after it semen was extended in BTS (1:2, v: v); ²Treatments was the period of holding time at 17 °C prior to short-cryopreservation protocol; ³Centrifugation 2200 x g/ 3min; ⁴Extension with the Botu-Sui®- composed of sugars, amino acids, buffers, 20% egg yolk (v/v), antibiotics, 2% glycerol as a cryoprotectant, and 2% methylformamide (v/v); ⁵ Short-cryopreservation protocol;

Fig. 1. Experimental design schema.

640 nm.

Plasma and acrosomal membranes were assessed with Propidium Iodide (PI; 3.3 µg/mL; band pass filter of 610/20 nm) and *Pisum sativum* agglutinin conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC-PSA; 0.6 mg/mL; band pass filter of 530/30 nm). Sperm samples were stained simultaneously with S59, PI and FITC-PSA [12], and incubated at 37 °C for 10 min. After incubation the samples were diluted by the addition of 150 µL of TALP and were analyzed by flow cytometry [2,51].

The functionality of electron transport chain was evaluated in live cells (PI negative) by 5,5',6,6'-tetra-chloro-1,1',3,3'-tetra-ethylbenzimidazolyl carbocyanine iodide (JC-1 – 1 µM; band pass filter of 585/40 nm). After dilution in TALP, PT samples were stained (37 °C/10 min) with S59, PI and JC-1 [12]. After incubation the samples were diluted by the addition of 150 µL of TALP and JC-1 mean fluorescence intensity of viable cells (PI negative) were evaluated by flow cytometry [12].

The dihydroethidium (DHE; 2 µM; band pass filter of 585/40 nm) was used to assess (by median fluorescence intensity) the amount of O₂⁻ [41]. DHE was added to semen samples and incubated at 37 °C for 10 min. After incubation Yo-Pro1 (YP; 50 nM; band pass filter of 530/30 nm) was added and incubated for 10 min. Finally, cells were stained with S59 for 10 min [12]. After incubation the samples were diluted by the addition of 150 µL of TALP and DHE median fluorescence intensity (arbitrary units) of viable cells (YP negative) were evaluated by flow cytometry.

The fluidity of plasma membrane was assessed with Merocianine 540 (M540; 16.2 µM; band pass filter of 585/40 nm). Samples were stained with YP, and after 10 min of incubation S59 was added and incubated for 10 min at 37 °C [12]. M540 was added followed by incubation for 70 s [15,39]. After incubation the samples were diluted by the addition of 150 µL of TALP and M540 median fluorescence intensity (arbitrary units) of viable cells (YP negative) were evaluated by flow cytometry.

C11-BODIPY581/591 probe (BP; 6.67 µg/mL; band pass of 530/30 nm) was used to evaluate peroxidation of spermatozoa membranes. Semen aliquots were stained with BP for 20 min at 37 °C [30]. After the incubation period, samples were stained with PI and S59 [12]. Ten minutes after, sperm were diluted in TALP to 2.5 × 10⁶ spermatozoa/mL and were analyzed by flow cytometry. The green BP median intensity of fluorescence emission (arbitrary units) was analyzed by flow cytometry for the viable sperm (PI negative).

2.8. Statistical analysis

Holding time periods were considered the fixed variables, and boars were considered random variables. The residue normality and homogeneity of variances were verified, and when every necessary data was transformed by logarithm or arcsine function. Treatment effect were analyzed using the Tukey-Kramer SAS MIXED procedure (SAS[®] Studio, Copyright[®] 2012-2017, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). All statistical analyses were considered significant at p < 0.05, and all results are expressed as the means ± SEM.

3. Results

3.1. Computer-assisted sperm analysis (CASA)

Cryopreservation of boar semen on the simplified protocol could be improved (p < 0.05) by the use of holding time from 4 h, improving total, progressive motility and the percentage of rapid spermatozoa (Table 1). Furthermore, the highest (p < 0.05) percentage of progressive motility and rapid spermatozoa were obtained with 24 h of HT compared to 0 h of HT (Table 1). To total motility 8 and 24 h of HT resulted on highest values compared to 0 h of HT (p > 0.05; Table 1). All other spermatozoa characteristics evaluated by CASA (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, ALH, BCF, HYPER) were not impaired (p > 0.05) by any time of holding (Table 1).

Table 1
Mean (\pm SEM) effects of holding time on simplified protocol to cryopreservation of boar spermatozoal on motility characteristics.

	Holding time periods (hours)							
	0	4	8	12	24	28	32	
TM (%)	8.45 \pm 1.11 ^b	12.05 \pm 1.47 ^{a,b}	16.47 \pm 2.55 ^a	15.37 \pm 2.66 ^{a,b}	20.72 \pm 3.33 ^b	13.71 \pm 1.68 ^{a,b}	13.62 \pm 2.62 ^{a,b}	
PM (%)	5.22 \pm 0.82 ^b	7.48 \pm 1.05 ^{a,b}	10.53 \pm 1.86 ^{a,b}	9.76 \pm 2.10 ^{a,b}	13.17 \pm 2.75 ^b	8.48 \pm 1.18 ^{a,b}	8.60 \pm 1.91 ^{a,b}	
Rapid (%)	4.42 \pm 0.75 ^b	5.89 \pm 1.05 ^{a,b}	8.79 \pm 1.72 ^{a,b}	8.71 \pm 2.03 ^{a,b}	11.18 \pm 2.50 ^b	6.94 \pm 1.15 ^{a,b}	6.36 \pm 1.46 ^{a,b}	
VCL(μ m/s)	51.98 \pm 2.22	50.84 \pm 1.92	51.28 \pm 2.31	48.09 \pm 2.04	51.64 \pm 2.64	50.82 \pm 1.88	49.98 \pm 2.98	
VSL(μ m/s)	24.36 \pm 2.33	24.85 \pm 2.14	24.94 \pm 2.25	22.41 \pm 2.56	25.50 \pm 2.68	26.14 \pm 2.17	25.26 \pm 2.70	
VAP(μ m/s)	31.99 \pm 2.30	31.63 \pm 1.87	32.57 \pm 2.24	29.45 \pm 2.33	32.98 \pm 2.45	32.91 \pm 2.02	32.09 \pm 2.55	
LIN (%)	46.00 \pm 2.91	46.96 \pm 2.93	47.44 \pm 3.11	45.50 \pm 3.75	48.53 \pm 3.43	51.00 \pm 3.03	50.80 \pm 3.47	
STR (%)	74.66 \pm 2.09	74.96 \pm 2.03	74.52 \pm 2.51	73.50 \pm 2.92	75.47 \pm 2.70	78.44 \pm 1.77	77.68 \pm 2.39	
ALH (μ m)	2.74 \pm 0.08	2.72 \pm 0.08	2.66 \pm 0.07	2.57 \pm 0.07	2.70 \pm 0.09	2.59 \pm 0.08	2.63 \pm 0.09	
BCF (Hz)	5.86 \pm 0.20	5.72 \pm 0.26	5.73 \pm 0.25	5.42 \pm 0.27	5.80 \pm 0.33	6.00 \pm 0.24	5.93 \pm 0.24	
Hyper (%)	1.17 \pm 0.13	1.57 \pm 0.25	1.72 \pm 0.21	1.43 \pm 0.19	1.40 \pm 0.25	1.19 \pm 0.20	1.30 \pm 0.35	

TM – total motility; PM – progressive motility; VCL – curvilinear velocity; VSL – straight-line velocity; VAP – average path velocity; LIN – linearity; STR – straightness; ALH – amplitude of lateral head displacement; BCF – beat cross frequency; Hyper – hyperactivated spermatozoa.

^{a,b} Within a row, means without a common superscript differed ($p < 0.05$).

3.2. Flow cytometry assays

Plasma and acrosomal membrane integrity and membrane fluidity were evaluated to verify the effects of HT. Spermatozoa cryopreservation after 4, 8, 24, 28 and 32 h of holding are able to increase ($p < 0.05$) the percentage of spermatozoa with intact plasma and acrosomal membranes (IPIA; Fig. 2A). However, highest ($p < 0.05$) results are obtained after 24 h of HT compared to 0 and 12 h of HT (Fig. 2A). Furthermore, use of holding time does not change ($p > 0.05$) levels of plasma membrane fluidity (Fig. 2B).

Since holding time can affect sperm metabolism, mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) of viable cells was analyzed. Cryopreservation of boar spermatozoa after 8 h of incubation at 17 °C increase ($p < 0.05$) $\Delta\psi_m$ of viable cells (Fig. 2C). Furthermore, holding time of 32 h result on the highest $\Delta\psi_m$ ($p < 0.05$) values compared to 0 and 4 h of HT (Fig. 2C).

Oxidation effects of holding time were mensurated using superoxide anion levels and membrane lipid peroxidation. To both variables, holding time was deleterious. Lower oxidative changes were detected only at 0 h ($p < 0.05$) of holding to detection of superoxide anion (Fig. 3A) compared to 4, 8, 12, 24, 28, and 32 h of HT and at 0, 4 and 8 h ($p < 0.05$) to lipid peroxidation compared to 32 h of HT (Fig. 3B).

4. Discussion

Holding time is widely used to cryopreserve boar semen, to facilitate its manufacture semen is hold at 17 °C for 24 h. However, the ideal period that semen must be in contact with its own seminal plasma, without harmful effects, is unknow. The literature brings us some holding time results, that were discussed below. Since any of these studies evaluated long holding time periods, them were not able to demonstrate the increasing of PT sperm characteristics among evaluated time until 24 (in general), and then was observed an overall decrease of PT boar spermatozoa quality at longer periods of holding.

The effect of holding time to motile characteristics was previously described and remains controversial. Wasilewska and Fraser [53] described that holding time of 24 h at 10 °C improves total and progressive motility when compared to 2 h at 17 °C. Further, PT spermatozoa total motility did not show any improvement with 3 or 24 h of holding prior to cryopreservation, but progressive motility was benefited when incubated for 24 h [54]. On the other hand, no differences on sperm cells motility were observed on post-thawed semen after 3 or 24 h of holding [19]. In the same way, Tomás et al. [50] showed that cooling boar spermatozoa prior to cryopreservation for long times (24 h) did not improve total and progressive motility compared to short periods (2 and 8 h). On another view of holding time effect, Eriksson et al. [14]

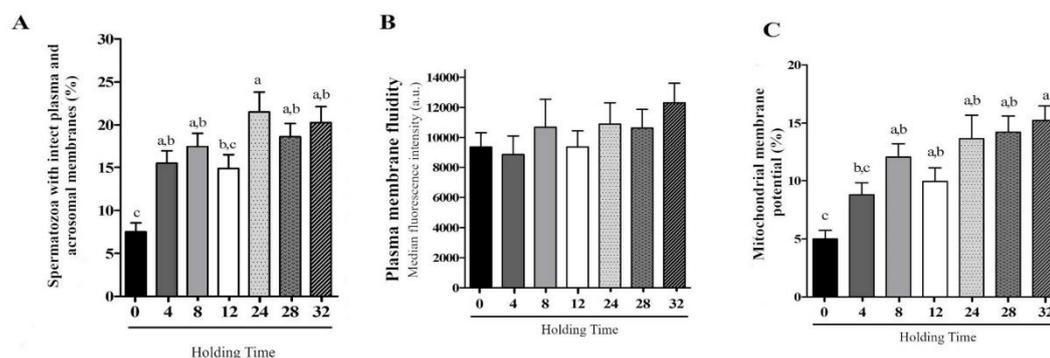


Fig. 2. Mean (\pm SEM) of effects of holding time on simplified protocol to cryopreservation of boar spermatozoa on (A) Spermatozoa with intact plasma and acrosomal membranes, (B) plasma membrane fluidity, and (C) mitochondrial membrane potential. ^{a-c} Within graphics, means without a common superscript differed ($p < 0.05$).

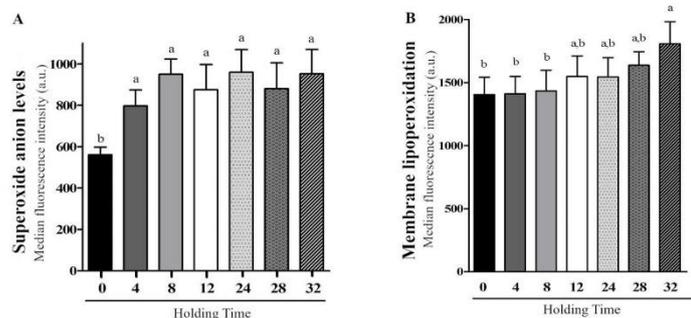


Fig. 3. Mean (\pm SEM) of effects of holding time on simplified protocol to cryopreservation of boar spermatozoa on (A) Superoxide anion levels, and (B) membrane liperoxidation. ^{a-c} Within graphics, means without a common superscript differed ($p < 0.05$).

demonstrated that 20 h of cooling prior to cryopreservation could be deleterious to sperm cells motility compared to 3 and 10 h of holding. These results were the opposite of our finds, in which, we found the beneficial effect of 24 h of holding time to total and progressive motility.

Ejaculated spermatozoa are able to absorb low molecular weight seminal plasma proteins [26,27]. Thus, incubation of spermatozoa prior to cryopreservation in its own, slightly extended, seminal plasma could allow spermatozoa to incorporate a greater amount of proteins. In this way, seminal calcitonin could be incorporate to boar spermatozoa during holding time. This protein was highly positively correlated ($r = 0.8581$, $p < 0.05$) with sperm cells motility [29]. Therefore, it can explain our finds, which the beneficial effect of 24 h of holding time to total and progressive motility. Papan et al. [34] described some correlations between seminal plasma ionic environment and sperm functionality. These authors find a positive correlation of selenium levels in seminal plasma with total and progressive motility ($r = 0.674$, $r = 0.563$ respectively, $p < 0.05$). However, these authors also described a negative correlation of calcium concentration in seminal plasma ($r = -0.436$, $p < 0.05$) with progressive motility, as calcium is known to regulate sperm motility. This regulation is concentration-dependent, in which low concentration stimulate sperm motility and high concentration can inhibit motility [4]. Some seminal prostomes are responsible for carrying calcium [31] and they are able to bind and transfer its contents to spermatozoa [5]. However, a long exposition to seminal prostomes can possibly increase intracellular calcium, which can explain why long incubation time (28 and 32 h) did not show any improvement on sperm cells motility.

The use of holding time to cryopreservation of boar spermatozoa showed beneficial effects, when used for 24 h, corroborating with other studies. Twenty-four hours of holding time at 10 °C is better than 2 h at 17 °C to plasma membrane integrity to most evaluated animals, but the same results were not observed to acrosome integrity [53]. Post-thawed plasma membrane integrity can be improved by increasing from 3 to 24 h of holding, but, acrosome integrity did not follow this same improvement [54]. Short times of holding (3 h) did not have the same beneficial effect to plasma membrane integrity than little longer (10 and 20 h) holding times [14].

Those finds can be explained by the hypothesis that the bind of sperm proteins (BSP) also known as spermadhesin have the ability to bind to spermatozoa plasma membrane after ejaculation via choline phospholipids. BSP superfamily proteins can be classified by their ability of binding to heparin (HBP, which include AQN-1, AQN-3, AWN) or not (PSP-I, PSP-II) [35,43]. The heparin-binding protein AQN-1 is related to plasma membrane integrity [6], while AWN-1 and AQN-3 are related to acrosome stabilization [13]. In rams, BSP1 and BSP5 are able to improve sperm viability and revert cold-shock-induced damage

on sperm membranes [32]. Furthermore, boar spermatozoa cryopreserved after holding time of 24 h increases phosphorylation levels of serine residues of HSP70 (heat-shock protein 70 kDa) compared to 3 h of holding. Heat-shock protein is able to protect spermatozoa of cold-shock, resulting in the improvement of sperm membrane integrity and higher cryotolerance [54]. Thus, it is possible to understand how 24 h of holding increase post-thawing integrity of plasma and acrosomal membranes. However, effect of BSP proteins is time and concentration-dependent [25,27]. After long exposition (up to 8 h) to BSP proteins induces phospholipid and cholesterol efflux from the spermatozoa outer membrane, which in turn, induce fragility of plasma membrane and its susceptibility to cold-shock [48,49], which may explain the fact that long periods of holding time impair some characteristics of semen.

Wasilewska and Fraser [53] described that 24 h at 10 °C is better than 2 h at 17 °C to mitochondrial membrane potential. Endorsing our results, in which the percentage of live spermatozoa with high mitochondrial membrane potential increases after 4 h of holding. It could be explained by the fact that the holding time may be required to balance some enzymes between seminal plasma and spermatozoa. Glutathione (GSH) and alkaline phosphatase (ALP) may allow the availability of fructose as a source of energy to spermatozoa mitochondria. Reduced glutathione is involved in spermatozoa fructolysis [47]. Alkaline phosphatase acts in the synthesis and availability of fructose for spermatozoa [22]. Since mitochondrial oxidative phosphorylation (of fructose - OXPHOS) is the main source energy of boar spermatozoa [18], these events seem to be crucial. Possibly as consequence of that improvement of mitochondrial membrane potential we observed an increase on lipid peroxidation (from 12 h of holding) and on superoxide anion levels (from 4 h of holding). It could be due to the use of antioxidation enzymes for fructose availability, as previous mentioned; and also, to the electron transfer chain (ETC) of OXPHOS stimulates the ROS (reactive oxygen species) production [18,47]. Thus, it could cause an imbalance of antioxidation and pro-oxidation agents. Furthermore, Papan et al. [34] described that iron and selenium had a positive correlation ($r = 0.469$, $r = 0.467$ respectively, $p < 0.05$) with plasma membrane integrity. Stored boar sperm (during holding) is under oxidative conditions, since its metabolism is active [23]. Thus, to maintain equilibration between pro-oxidative and antioxidants, avoiding oxidative damages, iron is consumed by Fe-dependent enzymes (as catalase), and selenium is consumed to maintain levels of glutathione peroxidase. Therefore, concentration of these ions possibly decreases during cooling and holding time, impairing on decrease of antioxidants potential. Concentration of this enzyme prior to cryopreservation is related to post-thawed semen quality [9]. However, our finds regard oxidation effects do not corroborate to Yeste et al. [54], which described, to long-cryopreservation protocol, that levels of intracellular peroxide did not change on post-thawing when spermatozoa

were cryopreserved with 3 or 24 h of holding. Indeed, these oxidation changes do not impair integrity either fluidity of sperm membranes. Thus, the deleterious effect of ROS levels increment was not observed in this study. Despite the increased levels of ROS and lipoperoxidation, these may still be physiologic for the sperm cells. Furthermore, the possible harmful effects of oxidation are surpassed by the beneficial effects on membranes integrity and mitochondrial metabolism.

During and after ejaculation the HBP bind to sperm surface and act as decapacitant proteins protecting spermatozoa to premature capacitation [35,43]. Another molecule associated to seminal decapacitant potential is cholesterol [10], which half of seminal cholesterol is associated to exosomes [11]. Piehl et al. [33] demonstrate that the exosomes and liposomes are able to block capacitation cholesterol-dependent and the increase plasma membrane fluidity. However, the interaction between spermatozoa and seminal HBP, exosomes and liposomes seem to not be benefited by increase of holding times, thus cooling of boar spermatozoa prior to short-cryopreservation protocol did not show any improvement to plasma membrane stability in this study. Nevertheless, to the long-cryopreservation protocol the use of holding time of 24 h at 10 °C prior to cryopreservation was able to decrease plasma membrane permeability compared to incubation of 2 h at 17 °C [53]. Sperm plasma membrane permeability and lipid disorder increase on thawed boar spermatozoa cryopreserved after short (3 h) holding time compared to 24 h of incubation [54].

Therefore, our results showed that hold boar semen for 24 h prior to short-cryopreservation protocol increase total and progressive motility, rapid spermatozoa, integrity of plasma and acrosome membranes. To mitochondrial membrane potential 32 h is needed to reach the highest values. However, was not able to control amount of superoxide anion neither membrane lipid peroxidation and had no effects on plasma membrane fluidity. Thus, to reach the best results of PT boar semen the ideal holding time prior to cryopreservation is 24 h.

Conflicts of interest

The authors state that they have no conflict of interest.

Author contributions

M.A.T. conceived and designed the research study, wrote the paper, performed the experiments and analyzed the results; M.S.M. performed and analyzed the experiments and collaborated with the writing; M.S.P. performed the experiments; S.M.M.K.M. collaborated with results analysis; AFCA collaborated in the design, the results analysis and writing.

Funding

This work was supported by the São Paulo Research Foundation – FAPESP [grant numbers 2015/17620-7, 2016/09441-8 and 2016/24690-4].

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.12.004>.

References

- [1] F.C. Almeida, S. V. Silva, H.M. Souza, W.A. Gomes, J.A.C. Lima Filho, A.A. Wicke, A.M. Batista, M.M.P. Guerra, Effects of glycerol, equilibration time and antioxidants on post-thaw functional integrity of bovine spermatozoa directly obtained from epididymis, *Andrologia* 49 (2017) 1–9.
- [2] A.F.C. Andrade, F.G. Zaffalon, E.C.C. Celeghini, J. Nascimento, F.F. Bressan, S.M.M.K. Martins, R.P. Arruda, Post-thaw addition of seminal plasma reduces tyrosine phosphorylation on the surface of cryopreserved equine sperm, but does not reduce lipid peroxidation, *Theriogenology* 77 (2012) 1866–1872.
- [3] D. Bavister, M. Lorraine, Development of preimplantation in a defined embryo of the golden culture medium, *Biol. Trace Elem. Res.* 28 (1983) 235–247.
- [4] A. Bhoumik, S. Saha, G.C. Majumder, S.R. Dzungdung, Optimum calcium concentration: a crucial factor in regulating sperm motility in vitro, *Cell Biochem. Biophys.* 70 (2014) 1177–1183.
- [5] H.P. Burden, C.H. Holmes, R. Persad, K. Whittington, Prostatomes- their effects on human male reproduction and fertility, *Hum. Reprod. Update* 12 (2006) 283–292.
- [6] I. Caballero, J.M. Vazquez, G.M. Mayor, C. Almiñana, J.J. Calvete, L. Sanz, J. Roca, E.A. Martinez, PSP-I/PSP-II spermadhesin exert a decapacitation effect on highly extended boar spermatozoa, *Int. J. Androl.* 32 (2009) 505–513.
- [7] G. Carvajal, C. Cuello, M. Ruiz, J. M Vazquez, E.A. Martinez, J. Roca, Effect of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival, *J. Androl.* 25 (2004) 389–396.
- [8] I. Casas, G.C. Althouse, The protective effect of a 17 °C holding time on boar sperm plasma membrane fluidity after exposure to 5 °C, *Cryobiology* 66 (2013) 69–75.
- [9] S. Cerolini, A. Maldijan, F. Pizzi, T.M. Glozzi, Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen, *Reproduction* 121 (2001) 395–401.
- [10] N.L. Cross, Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesterone: cholesterol is the major inhibitor, *Biol. Reprod.* 54 (1996) 138–145.
- [11] N.L. Cross, P. Mahasreshthi, Prostatome fraction of human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist progesterone, *Arch. Androl.* 39 (1997) 39–44.
- [12] R. Diaz, M.A. Torres, E. Paz, J. Quiñones, S. Bravo, J.G. Farías, N. Sepúlveda, Dietary inclusion of fish oil changes the semen lipid composition but does not improve the post-thaw semen quality of ram spermatozoa, *Anim. Reprod. Sci.* 183 (2017) 132–142.
- [13] Z. Dostálová, J.J. Calvete, L. Sanz, E. Töpfer-Petersen, Boar spermadhesin AWN-1. Oligosaccharide and zona pellucida binding characteristics, *Eur. J. Biochem.* 230 (1995) 329–336.
- [14] B.M. Eriksson, J.M. Vazquez, E.A. Martinez, J. Roca, X. Lucas, H. Rodríguez-Martínez, Effects of holding time during cooling and of type of package on plasma membrane integrity, motility and in vitro oocyte penetration ability of frozen-thawed boar spermatozoa, *Theriogenology* 55 (2001) 1593–1605.
- [15] F.M. Flesch, B. Colenbrander, L.M. Van Golde, B.M. Gadella, Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262 (1999) 787–792.
- [16] I. Gale, L. Gil, C. Malo, N. González, F. Martínez, Effect of Camellia sinensis supplementation and increasing holding time on quality of cryopreserved boar semen, *Andrologia* 47 (2014) 505–512.
- [17] D.L. Garner, E.S.E. Hafez, Espermatozoide e plasma seminal, in: E.S.E. Hafez (Ed.), *Reprodução Animal*, 7, Manole Ltda, Barueri, 2004, pp. 97–110 Cap.7.
- [18] H. Guo, Y. Gong, B. He, R. Zhao, Relationships between mitochondrial DNA content, mitochondrial activity, and boar sperm motility, *Theriogenology* 87 (2017) 276–283.
- [19] H.D. Guthrie, G.R. Welch, Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm, *Theriogenology* 63 (2005) 396–410.
- [20] P.O. Hofmo, I.S. Grevle, Development and commercial use of frozen use of frozen boar semen in Norway, in: L.A. Johnson, H.D. Guthrie (Eds.), *Boar Semen Preservation IV*, Allen Press, Lawrence, KS, 2000, pp. 71–86.
- [21] N.S. Juyena, C. Stelletta, Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa, *J. Androl.* 33 (2012) 536–551.
- [22] G.J. King, J.W. Macpherson, Alkaline and acid phosphatase activity, pH and osmotic pressure of boar semen, *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 30 (1966) 304–307.
- [23] A. Kumaresan, G. Kadirvel, K.M. Bujarbaruah, R.K. Bardoloi, A. Das, S. Kumar, S. Naskar, Preservation of boar semen at 18 °C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa, *Anim. Reprod. Sci.* 110 (2009) 162–171.
- [24] R. Lançoni, E.C.C. Celeghini, M.B.R. Alves, K.M. Lemes, A.M. Gonella-Diáza, L.Z. Oliveira, R.P. Arruda, Melatonin added to cryopreservation extenders improves the mitochondrial membrane potential of postthawed equine sperm, *J. Equine Vet. Sci.* 69 (2018) 78–83.
- [25] P. Manjunath, V. Nauc, A. Bergeron, M. Menard, Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk, *Biol. Reprod.* 67 (2002) 1250–1258.
- [26] K.W. Metz, T. Berger, E.D. Clegg, Adsorption of seminal plasma proteins by boar spermatozoa, *Theriogenology* 34 (1990) 691–700.
- [27] A.I. Moore, E.L. Squires, J.K. Graham, Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa, *Theriogenology* 63 (2005) 2372–2381.
- [28] H.D. Moore, K.G. Hibbit, The binding of labelled basic proteins by boar spermatozoa, *J. Reprod. Fertil.* 46 (1976) 71–76.
- [29] N.A. Mungan, G. Mungan, M.M. Basar, M. Baykam, A. Atan, Effect of seminal plasma calcitonin levels on sperm motility, *Arch. Androl.* 47 (2001) 113–117.
- [30] D.M. Neild, J.F. Brouwers, B. Colenbrander, A. Agüero, B.M. Gadella, Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa, *Mol. Reprod. Dev.* 72 (2005) 230–238.
- [31] K.-H. Park, B.-J. Kim, J. Kang, T.-S. Nam, J.M. Lim, H.T. Kim, J.K. Park, Y.G. Kim, S.-W. Chae, U.-H. Kim, Ca²⁺ signaling tools acquired from prostatomes are required for progesterone-induced sperm motility, *Sci. Signal.* 4 (2011) ra31.
- [32] R. Perez-Pe, J.A. Cebrian-Perez, T. Muino-Blanco, Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa, *Theriogenology* 56 (2001) 425–434.
- [33] L.L. Piehl, M.L. Fischman, U. Hellman, H. Cisale, P.V. Miranda, Boar seminal plasma exosomes: effect on sperm function and protein identification by sequencing, *Theriogenology* 79 (2013) 1071–1082.
- [34] M.Z. Pipan, J. Mrkun, B.J. Strajn, K.P. Vrtača, J. Kos, A. Pišlar, P. Zrimšek, The influence of macro- and microelements in seminal plasma on diluted boar sperm quality, *Acta Vet. Scand.* 59 (2017) 1–11.

- [35] G. Plante, B. Prud'homme, J. Fan, M. Lafleur, P. Manjunath, Evolution and function of mammalian binder of sperm proteins, *Cell Tissue Res.* 363 (2016) 105–127.
- [36] V.G. Pursel, L. Schulman, L.A. Johnson, Effect of holding time on storage of boar spermatozoa at 5 °C, *J. Anim. Sci.* 37 (1973) 785–789.
- [37] V.G. Pursel, L.A. Johnson, Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure, *J. Anim. Sci.* 40 (1975) 99–102.
- [38] L. Qian, S. Yu, Y. Zhou, Protective effect of hyaluronic acid on cryopreserved boar sperm, *Int. J. Biol. Macromol.* 87 (2016) 287–289.
- [39] R. Rathi, B. Colenbrander, M.M. Bevers, B.M. Gadella, Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa, *Biol. Reprod.* 65 (2001) 462–470.
- [40] G.M. Ravagnani, M.A. Torres, D.F. Leal, S.M.M.K. Martins, F.O. Papa, J.A. Dell'aqua Junior, M.A. Alvarenga, A.F.C. Andrade, Cryopreservation of boar semen in 0.5-mL straws at low spermatozoa concentrations is better than high concentrations to maintaining sperm viability, *Pesqui. Vet. Bras.* 38 (9) (2018) 1726–1730.
- [41] J.B. Rice, L.L. Stoll, W.G. Li, G.M. Denning, J. Weydert, E. Charipare, W.E. Richenbacher, F.J. Miller, N. Weintraub, Low-level endotoxin induces potent inflammatory activation of human blood vessels: inhibition by statins, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23 (2003) 1576–1582.
- [42] J. Roca, I. Parrilla, A. Bolarin, E.A. Martinez, H. Rodriguez-Martinez, Will AI in pigs become more efficient? *Theriogenology* 88 (2016) 187–193.
- [43] H. Rodriguez-Martinez, U. Kvist, J. Ernerudh, L. Sanz, J.J. Calvete, Seminal plasma proteins: what role do they play? *Am. J. Reprod. Immunol.* 66 (SUPPL) (2011) 11–22.
- [44] F. Saravia, Cryopreservation of Boar Semen: Impact of the Use of Specific Ejaculate Portions, Concentrated Packaging, and Simplified Freezing Procedures on Sperm Cryosurvival and Potential Fertilizing, 63f. Doctoral thesis - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2008 2008.
- [45] H. Schmidt, G. Kamp, Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis, *Reproduction* 128 (2004) 171–179.
- [46] C.G. Silva, E.R. Cunha, G.R. Blume, J.V. Malaquias, S.N. Bão, C.F. Martins, Cryopreservation of boar sperm comparing different cryoprotectants associated in media based on powdered coconut water, lactose and trehalose, *Cryobiology* 70 (2015) 90–94.
- [47] R. Slaweta, T. Laskowska, The effect of glutathione on the motility and fertility of frozen bull semen, *Anim. Reprod. Sci.* 13 (1987) 249–253.
- [48] I. Thérien, R. Moreau, P. Manjunath, Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm, *Biol. Reprod.* 59 (1998) 768–776.
- [49] I. Thérien, R. Moreau, P. Manjunath, Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm, *Biol. Reprod.* 61 (1999) 590–598.
- [50] C. Tomás, J. Gómez-Fernández, E. Gómez-Izquierdo, E. De Mercado, 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, *Anim. Reprod. Sci.* 144 (2014) 115–121.
- [51] M.A. Torres, R. Díaz, R. Boguen, S.M.M.K. Martins, G.M. Ravagnani, D.F. Leal, M.L. Oliveira, B.B.D. Muro, B.M. Parra, F.V. Meirelles, F.O. Papa, J.A. Dell'aqua, M.A. Alvarenga, A.S. Moretti, N. Sepúlveda, A.F.C. Andrade, Novel flow cytometry analyses of boar sperm viability: can the addition of whole sperm-rich fraction seminal plasma to frozen-thawed boar sperm affect it? *PLoS One* 11 (2016) e0160988.
- [52] M.A. Torres, G.M. Ravagnani, D.F. Leal, S.M.M.K. Martins, B.B.D. Muro, F.V. Meirelles, F.O. Papa, J.A. Dell'Aqua Junior, M.A. Alvarenga, A.S. Moretti, A.F.C. De Andrade, Seminal plasma arising from the whole boar sperm-rich fraction increases the stability of sperm membrane after thawing, *J. Anim. Sci.* 94 (2016) 1906–1912.
- [53] K. Wasilewska, L. Fraser, Boar variability in sperm cryo-tolerance after cooling of semen in different long-term extenders at various temperatures, *Anim. Reprod. Sci.* 185 (2017) 161–173.
- [54] M. Yeste, E. Estrada, M.M. Rivera Del Álamo, S.T. Bonet, J.E. Rodríguez-Gil, The increase in phosphorylation levels of serine residues of protein HSP70 during holding time at 17°C is concomitant with a higher cryotolerance of boar spermatozoa, *PLoS One* 9 (2014) 1–19.
- [55] M. Yeste, Recent Advances in boar sperm cryopreservation: state of the art and current perspectives, *Reprod. Domest. Anim.* 50 (Suppl. 2) (2015) 71–79.