

ANA CAROLINA PEDROSA

**Estudo do perfil de miRNAs de ejaculados suínos com diferentes
congelabilidades**

São Paulo
2021

ANA CAROLINA PEDROSA

Estudo do perfil de miRNAs de ejaculados suínos com diferentes congelabilidades

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

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. André Furugen Cesar de Andrade

Coorientador:

Prof. Dr. Juliano Coelho da Silveira

São Paulo

2021

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 4061 FMVZ	<p>Pedrosa, Ana Carolina Estudo do perfil de miRNAs de ejaculados suínos com diferentes congelabilidades / Ana Carolina Pedrosa. – 2021. 74 f. : il.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2021.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal. Área de concentração: Reprodução Animal. Orientador: Prof. Dr. André Furugen Cesar de Andrade. Coorientador: Prof. Dr. Juliano Coelho da Silveira.</p> <p>1. Criopreservação. 2. Vesículas extracelulares. 3. microRNA. 4. Espermatozoide. 5. Cachaços. I. Título.</p>
-----------------	--

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo do perfil de micro-RNAS do sêmen de cachaços com diferentes congelabilidades", protocolada sob o CEUA nº 3756081018 (ID 006343), sob a responsabilidade de **André Furugen César de Andrade e equipe; Ana Carolina Pedrosa** - 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 27/03/2019.

We certify that the proposal "Study of the micro-RNAS profile of the semen of boars with different freezes", utilizing 27 Swines (27 males), protocol number CEUA 3756081018 (ID 006343), under the responsibility of **André Furugen César de Andrade and team; Ana Carolina Pedrosa** - 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 03/27/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **10/2018** a **12/2020** Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Animais provenientes de estabelecimentos comerciais**

Espécie: **Suínos** sexo: **Machos** Idade: **1 a 3 anos** N: **27**

Linhagem: **DB30 e DB20** Peso: **220 a 350 kg**

Local do experimento: **DB Genética Suína - Varjão de Minas (MG).**

São Paulo, 01 de abril de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traaldi

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: PEDROSA, Ana Carolina

Título: Estudo do perfil de miRNAs de ejaculados suínos com diferentes congelabilidades

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

Data: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*À minha amada família,
dedico esta e todas as outras conquistas da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Ainda que eu discorra por quatro mil páginas, não seria capaz de agradecer devidamente à maneira que cada um aqui citado merece. Sendo assim, peço que aceitem estas singelas palavras.

Sou, imensuravelmente, grata à **Deus**, por ter atendido cada pedido do meu coração e ter me dado forças para, mesmo com tantas adversidades, não desistir deste grande sonho. Além disso, agradeço por, depois de ter vivenciado esta fase, que foi tão doce e tão amarga, ter me auxiliado aprofundamente em manter e revigorar quem eu sempre fui e sou: uma grande sonhadora.

Agradeço à minha **família**, pelos exemplos dados no lar e por terem me mostrado, desde cedo, a importância do estudo. Em especial, à minha mãe querida, **Leila**, que sempre foi a minha base; me guiando, incentivando e amparando nos momentos difíceis. Sabia que nada disso seria possível sem a senhora, te devo além da minha vida. Ao meu filho **Arthur**, que veio tão cedo me mostrar que eu preciso ser forte e não posso desistir, pois eu tenho por quem lutar e perseverar. Ao meu tio **Sérgio**, que embora não tenha sido capaz de estar comigo durante esta fase, foi um grande influenciador para que eu prosperasse na medicina veterinária. Sempre eternamente grata. À minha amada avó **D. Cida**, que com o seu jeito manso e simples, sempre valorizou e apoiou os meus estudos. Ao meu pai **Sinomar**, que proveu, durante muito tempo, todo o suporte necessário para que eu pudesse me manter estudando e seguindo este sonho. À **Olga**, quem tanto me amparou nos momentos de necessidade e sempre acreditou (e ressaltou) que eu poderia ir longe na vida.

Ao meu querido orientador, **Prof. André**, que me deu tantas oportunidades, acreditou no meu potencial (em alguns momentos, mais do que eu mesma), me acolheu, desafiou, criticou e por muitas vezes, me disse “não”. Hoje, eu sou plenamente capaz de enxergar como minha escolha pelo senhor e pelo mestrado na USP foi necessária e certa, e como eu precisava te-lo em minha vida durante esta fase. Obrigada por ter se empenhado comigo nos momentos de conquista ou de ideias, por ter me valorizado através de atitudes e não somente com palavras, por ter sido humano nos momentos de aflição e dificuldade, por ter me dado a liberdade necessária para estudar e trabalhar naquilo que sabia que me deixaria feliz, mas também, por ter me limitado quando eu queria abraçar o mundo e, claramente, não iria

conseguir. Tenho um carinho e gratidão especiais pelo senhor, pois, apesar de sermos tão diferentes em diversos aspectos, acredito que somos semelhantes em vários outros, principalmente, quando o assunto é aprender e se entusiasmar com as pequenas coisas. Acredito que nós tenhamos essa mesma vontade e necessidade de aprender. E, admiro que o senhor não tenha medo dos seus erros e de assumi-los, visando sempre aprender e evoluir com eles. Ao meu ver, aprender e se entusiasmar fazem parte dos grandes segredos da vida. Obrigada por tanto.

À todos os **professores da Universidade de São Paulo**, por me influenciarem e servirem de exemplo. Especialmente, à **Profa. Eneiva Carla**, pelo auxílio e carinho em tantos momentos, desde conversas, permissão para auxiliar e ser auxiliada pelos membros do seu grupo de pesquisa, até ao empréstimo de equipamentos para realizarmos experimentos. Ao **Prof. Guilherme Pugliesi**, pela confiança e auxílio me emprestando o aparelho de ultrassonografia e nas caronas até São Paulo para que eu pudesse assistir a sua disciplina, ao **Prof. Rubens**, pelo empréstimo de materiais, pelas longas e agradáveis conversas e principalmente, por servir de inspiração e ter feito tanto pela andrologia no nosso país. À **Profa. Simone**, muito obrigada pela convivência, carinho, boas risadas, conselhos, ensinamentos e por todo auxílio e dedicação que teve com o nosso trabalho. Ao **prof. Juliano**, por ter aceitado ser meu coorientador, ter investido na nossa pesquisa, por todo o conhecimento partilhado e dedicação com o nosso estudo. Ao **prof. Heidge**, por ter aberto as portas do seu laboratório para mim e permitido que eu me sentisse à vontade para trabalhar nele. Sou imensamente grata por ter os conhecido e tido a oportunidade de conviver com pessoas tão admiráveis e inspiradoras como os senhores.

À todos os **amigos do Departamento de Reprodução Animal**, especialmente, à **Cecília, Léo “Bati”, Amanda Zunkeller, Amanda Guimarães, Gilmar, Nataly, Karine, Thais, Igor, Thiago “Kumi”, Diego, Babi e Laís**. Obrigada pela amizade, boa convivência, auxílio em tantas situações, o companheirismo, os momentos de diversão e por terem feito tudo ficar mais leve, feliz e com “curtição”. Foi um prazer imenso te-los conhecido e partilhado um pouco da vida com vocês.

À toda a **equipe LATES**. Obrigada pelos bons momentos, pelas risadas, pelo apoio e auxílio nos momentos difíceis ou de estresse e também, por me receberem e me ensinarem tanto. Foi uma honra e um grande prazer fazer parte desta equipe tão querida. Levarei todos no meu coração e sempre me lembrarei das situações felizes e de “curtição” que vivemos.

À todos os funcionários que tive o prazer imenso de conhecer na Universidade de São Paulo e que foram imprescindíveis durante minha vivência por lá. Em especial, agradeço ao **Clayton, Harumi, D. Meire, Steves, Sr. Maurilio, Arina e Adriano**. Obrigada pelo auxílio, carinho e dedicação ao trabalho que possuem.

Aos **colegas e funcionários da Suinocultura da prefeitura do campus “Fernando Costa”**. Muito obrigada à todos vocês pela convivência, pelo auxílio, por compartilharem o conhecimento e toda a experiência de vocês, pelo respeito, carinho e principalmente, por confiarem no meu trabalho. Foi muito bom poder trabalhar e aprender com vocês.

Aos **membros do LMMD**, principalmente, à **Cibele, Jorge e Rosane** que foram essenciais para a execução do meu projeto de pesquisa. Obrigada por tanto.

À todos os bons amigos que o mestrado em Pirassununga me proporcionou. Especialmente, à **Cecília, Rafaela, D. Jô, Sr. Paulo e Beatriz**. Vocês foram como família em momentos em que, infelizmente, eu não pude ter a minha por perto. Sempre serei imensamente grata por tudo o que fizeram por mim. Vocês são especiais!

À **Universidade de São Paulo**, à **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, ao **Departamento de Reprodução Animal**, ao **Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal** e ao **campus “Fernando Costa”**. Me sinto extremamente grata e honrada pela oportunidade de realizar o meu mestrado nesta instituição e através deste programa, os quais me ofereceram infraestrutura, materiais e todos os recursos necessários para executar a minha e as demais pesquisas.

À empresa **DB Genética Suína – DanBred**, que por três vezes abriu as suas portas para mim e me permitiu, não somente, realizar o meu experimento de mestrado e ter meu primeiro emprego, mas também, tornou possível conhecer a forma exemplar com que trabalham. Agradeço em especial, ao **Diego Alkmin**, pela grande oportunidade de trabalhar com os animais desta empresa e também, à todos os funcionários e hoje, amigos, da Unidade de Difusão Genética de Varjão de Minas; **Stela, Antonio, Dinho, Patrícia, Maikon e Irmão**. Todos vocês foram peças-chave para a execução deste projeto. Obrigada por tudo!

Agradeço à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP** pelo fomento ao meu projeto (processo 2018/12500-1) através da bolsa concedida à mim durante parte do meu mestrado e por terem feito com que não faltassem recursos para a execução da minha pesquisa (processo 2016/24690-4). Também, sou grata à **Coordenação de**

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (001) pelo suporte financeiro conferido ao meu programa de pós-graduação e pela bolsa concedida à mim no início desta etapa.

Por fim, agradeço à todos os **animais** que, desde à infância, me inspiraram a seguir por este árduo caminho mas repleto de amor puro e verdadeiro. Especialmente, os **suínos**, que foram utilizados com respeito e dignidade, para que este trabalho pudesse ser exequível. Sem os animais e minha paixão por eles, nenhuma palavra aqui inserida teria o menor sentido.

“É com os tropeços que aprendemos a sair do chão”

(Chico Xavier)

RESUMO

PEDROSA, AC. **Estudo do perfil de miRNAs de ejaculados suínos com diferentes congelabilidades.** 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A criopreservação espermática é o método mais eficiente para preservar sêmen a longo prazo em mamíferos. No entanto, o congelamento do sêmen de cachaços ainda é o maior desafio para a indústria suína devido à alta sensibilidade ao choque frio das células espermáticas desta espécie e à variação dos resultados pós-descongelamento entre indivíduos e ejaculados do mesmo reprodutor. Para resolver esse problema, investigamos se os microRNAs (miRNAs) presentes em células espermáticas e pequenas vesículas extracelulares (EVs) do plasma seminal de ejaculados de suínos podem prever se ejaculados permanecerão com alta qualidade após passarem pelo processo de congelação-descongelação. Para tanto, foram coletados 27 ejaculados de alta qualidade de 27 machos (um de cada), obtidas amostras de miRNAs de espermatozoides e das EVs de plasma seminal *in natura* através de protocolos de centrifugação e, após o processo de criopreservação, determinamos dois grupos com diferentes congelabilidades considerando as análises de estrutura e funcionalidade dos espermatozoides após a descongelação ($P < 0,05$): Alta congelabilidade (AC; $n = 04$) e baixa congelabilidade (BC; $n = 04$). Feito isso, finalmente investigamos o perfil de miRNAs de espermatozoides e EVs de plasma seminal em ambos os grupos com diferentes congelabilidades. Nossos principais resultados mostraram que três miRNAs foram diferentemente abundantes em ejaculados BC, sendo o ssc-miR-503 encontrado em níveis mais elevados em células espermáticas. O ssc-miR-130a e o ssc-miR-9 foram mais abundantes em EVs do plasma seminal ($P < 0,10$). Por meio da análise de enriquecimento, foi possível verificar que esses miRNAs estão relacionados as modificações no desenvolvimento das células germinativas masculinas e na produção de energia utilizada pelos espermatozoides para manter sua viabilidade e funcionalidade. Portanto, por meio deste estudo, podemos demonstrar que o ssc-miR-503, ssc-miR-130a e ssc-miR-9 estão relacionados à baixa criotolerância espermática no sêmen de suínos. Deste modo, esses miRNAs podem ser usados como biomarcadores para prever sua baixa capacidade de tolerar o processo de criopreservação.

Palavras-chave: Criopreservação. Vesículas extracelulares. microRNA. Espermatozoide. Cachaços.

ABSTRACT

PEDROSA, AC. **Study of miRNAs profile of boars' ejaculates with different freezability.** 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Sperm cryopreservation is the most efficient method to preserve semen for the long term in mammals. However, freeze boar semen is still the biggest challenge for the swine industry due to the high cold shock sensitivity of boar sperm cells and the variance of post-thaw results among individuals and ejaculates from the same boar. To solve this problem, we investigate if microRNAs (miRNAs) present in sperm cells and small extracellular vesicles (E.V.s) from seminal plasma of raw boar ejaculates can predict high-quality ejaculates after underwent the freeze-thaw process. Therefore, we collected 27 high-quality ejaculates of 27 boars (one of each) obtained miRNAs samples of sperm cells and E.V.s from raw seminal plasma through centrifugation protocols. After the cryopreservation process, we determined two groups with different freezability considering the analysis post-thaw of structure and sperm functionality ($P < 0.05$): High freezability (H.F.; $n=04$) and low freezability (L.F.; $n=04$). That done, we finally investigate the miRNAs profile of sperm cells and E.V.s from seminal plasma in both groups with different freezability. Our main results showed that three miRNAs were differently abundant in L.F. ejaculates, being the ssc-miR-503 found in higher levels in sperm cells. The ssc-miR-130a and ssc-miR-9 most abundant in E.V.s from seminal plasma ($P < 0.10$). Through enrichment analysis, it was possible to verify that these miRNAs could be performing modifications in the development of male germ cells and in the production of energy to spermatozoa to maintain their viability and functionality. Therefore, through this study, we can demonstrate that ssc-miR-503, ssc-miR-130a, and ssc-miR-9 are related to low sperm cryotolerance in boars semen. So those miRNAs can be used as a biomarker to predict their low ability to tolerate the cryopreservation process.

Keywords: Cryopreservation. Extracellular vesicles. MicroRNA. Spermatozoa. Boar.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	A CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA EM SUÍNOS	17
2.1.1	Particularidades do ejaculado suíno e os desafios para criopreservação espermática	18
2.1.2	Protocolos para a congelação espermática em suínos	19
2.1.3	Diluentes de congelação espermática	21
2.1.4	A influência do indivíduo na congelabilidade espermática em suínos	22
2.1.5	Perspectivas na criopreservação do sêmen suíno	23
2.2	O PAPEL DOS miRNAs NA ANDROLOGIA SUÍNA	24
2.2.1	O processo de transcrição e tradução do genoma nos espermatozoides	24
2.2.2	Os transcritos dos espermatozoides	25
2.2.3	Biogênese e mecanismo de ação dos miRNAs na reprodução suína	25
2.2.4	Pequenas vesículas extracelulares	27
3	HIPÓTESE	29
4	OBJETIVOS	30
5	ARTIGO CIENTÍFICO - Spermatozoa and seminal plasma small extracellular vesicles miRNAs as biomarkers of boar semen cryotolerance	31
6	CONCLUSÕES	68
	REFERÊNCIAS	69
	APÊNDICE	74

1 INTRODUÇÃO

No que concerne as biotecnologias da reprodução, a criopreservação do sêmen é considerada uma das mais importantes, haja vista que, além de permitir a ampla difusão genética de animais superiores e a elaboração de bancos de germoplasma para uso futuro, também confere maior biossegurança seminal, principalmente quando comparado ao sêmen refrigerado e em conjunto, estes fatores podem promover grande impacto na cadeia de produção mundial. No entanto, quando se refere à espécie suína, esta biotecnologia é pouco utilizada, sendo empregada em não mais que 1% das inseminações artificiais realizadas (ANDRADE et al., 2019).

Um dos motivos que leva ao pouco uso do sêmen congelado na suinocultura é a baixa capacidade do espermatozoide suíno suportar o processo de criopreservação. A criopreservação causa danos severos ao espermatozoide, sendo capaz de alterar a sua estrutura e conseqüentemente, sua funcionalidade (YESTE; RODRÍGUEZ-GIL; BONET, 2017). Outro ponto-chave é a grande variabilidade de resultados de congelabilidade tanto entre indivíduos, quanto entre ejaculados de um mesmo cachaço, não havendo relação entre a qualidade espermática *in natura* e a capacidade das células espermáticas tolerarem bem o processo de criopreservação (ANDRADE et al., 2019; PEDROSA et al., 2020).

A fim de solucionar este entrave, tem-se realizado análises ultraestruturais dos espermatozoides e também, dos componentes do plasma seminal (YESTE, 2016). Dentre as moléculas estudadas recentemente, destacam-se os miRNAs, que são uma família de transcritos do genoma e atuam na regulação genica em diferentes processos biológicos e metabólitos, tendo sido descritos em humanos, camundongos, equinos, bovinos, suínos e outros (ALVES; CELEGHINI; BELLEANNÉE, 2020; DAS et al., 2013; KORHONEN et al., 2015; PEDROSA et al., 2020; VOJTECH et al., 2014; YADAV; KOTAJA, 2014). Estas pequenas moléculas, que possuem aproximadamente 23 nucleotídeos atuam através da ligação em mRNAs de genes codificadores de proteínas, degradando-os ou inibindo a ação pós-transcricional e, podem ser encontrados dentro de células ou no interior de pequenas vesículas extracelulares (VEs), que podem ser encontradas nos diversos fluidos corporais, incluindo o plasma seminal (BARTEL, 2009; CHEVILLET et al., 2014; VOJTECH et al., 2014). Em cachaços, os miRNAs atuam tanto ao longo da espermatogênese quanto após a fase de espermição, exercendo influência sobre a motilidade, integridade da membrana plasmática e até mesmo, capacitação espermática. Deste modo, pode-se afirmar que possuem um papel-

chave na qualidade seminal (CHEN et al., 2017; COUMANS et al., 2017; DU et al., 2016; MURDICA et al., 2019).

Tendo em vista que a qualidade do ejaculado *in natura* não está diretamente associada com a capacidade dos espermatozoides em suportar o processo de congelação, o presente estudo visa avaliar se o perfil de miRNAs de ejaculados de alta qualidade *in natura* está associado com a tolerância espermática após o processo de criopreservação e se estas importantes moléculas, podem ser utilizadas como biomarcadores de criotolerância espermática em suínos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA EM SUÍNOS

A criopreservação é o método mais eficiente de preservação seminal a longo prazo, pois mantém as células viáveis por tempo indeterminado. Este procedimento consiste na alta diminuição metabólica dos espermatozoides através do uso de baixas temperaturas associadas ao fornecimento energético adequado, que é conferido pelos diluidores de congelação à estas células altamente especializadas. Deste modo, os espermatozoides são capazes de manter a sua viabilidade e consequentemente, o seu potencial fertilizante por um período de tempo muito superior àquele conferido pelo sêmen refrigerado (GIBB; AITKEN, 2016; YESTE, 2016).

Em mamíferos, a congelação espermática é indicada, principalmente, para a formação de bancos de germoplasma, sendo o método mais indicado e, economicamente viável para este fim. No entanto, os benefícios do uso deste método de preservação vão muito além do citado. A criopreservação confere ao sêmen maior flexibilidade de uso, devido a sua alta durabilidade e, permite que este possa ser utilizado em ambientes remotos, não havendo a necessidade de solicitar doses frequentemente ou ter reprodutores treinados na propriedade (VICENTE-CARRILLO, 2016; YESTE, 2016). Por fim, o uso do sêmen congelado de suínos diminui ou torna até mesmo desnecessário, a permanência de reprodutores no plantel ou o transporte de avôs entre países (YESTE, 2015). Outro benefício-chave da congelação de sêmen da espécie suína está diretamente associado à biosseguridade. Isso porque, quando não manuseado seguindo as condições de higiene necessárias, tanto ao longo da colheita ou durante a preparação das doses inseminantes, o sêmen suíno pode ser um excelente meio de cultura para bactérias (DIAS et al., 2000; MORRELL et al., 2019; PROFET, 2015). Mas, em contrapartida, poucos microorganismos possuem a habilidade de se manterem viáveis após as drásticas alterações de temperatura que ocorrem durante o processo de congelação seminal, o que confere ao sêmen criopreservado uma maior biosseguridade quando comparado ao sêmen refrigerado (ANDRADE et al., 2019; TECHAKUMPHU M, BURANAAMNUAY K, TANTASUPARUK W, AM-IN, 2013).

2.1.1 Particularidades do ejaculado suíno e os desafios para criopreservação espermática

A baixa aplicabilidade comercial do sêmen suíno congelado deve-se à baixa tolerância dos espermatozoides desta espécie em suportar o choque frio e também, a grande variabilidade de resultados pós-descongelção, tanto entre ejaculados quanto entre indivíduos, fatos estes que, por muito tempo inviabilizaram uso do sêmen criopreservado de suínos em escala comercial (PEZO et al., 2019). No entanto, as pesquisas mais recentes neste âmbito, tem apresentado resultados promissores quanto a resolução deste grande desafio para a suinocultura (ANDRADE et al., 2019; PASSARELLI et al., 2020; PEDROSA et al., 2020; TORRES et al., 2019).

O processo de congelação e descongelção espermática pode induzir diversos danos ao espermatozoide, resultando em desordens estruturais e funcionais e, que podem culminar na morte celular (ANDRADE et al., 2012; CELEGHINI et al., 2008; JOVIČIĆ; CHMELÍKOVÁ; SEDMÍKOVÁ, 2020). Durante este procedimento, diversas mudanças químicas e físicas são necessárias, gerando alterações na temperatura, pH e osmolaridade natural do ejaculado. Além disso, sabe-se que quanto mais manipulada é uma célula e o meio no qual está inserida, maior é a possibilidade de que esta venha a sofrer lesões e que podem afetar diretamente a sua capacidade de tolerar o choque frio (JOVIČIĆ; CHMELÍKOVÁ; SEDMÍKOVÁ, 2020; VICENTE-CARRILLO, 2016).

O espermatozoide suíno possui importantes peculiaridades que influenciam a sua sensibilidade à temperaturas inferiores, fazendo com que 40 a 50% das células espermática não suportem a criopreservação. Embora a membrana plasmática destes espermatozoides seja estruturada em formato de mosaico, como qualquer outra membrana plasmática, os principais componentes desta estrutura são proteínas e lipídeos, sendo grande parte das proteínas, os receptores de membrana e ao menos 70% dos lipídeos, os fosfolipídeos (VICENTE-CARRILLO, 2016). No entanto, a membrana espermática dos suínos apresenta baixa concentração de moléculas de colesterol, o que a torna menos heterogênea e mais suscetível ao choque frio. Além disso, as células espermáticas de suínos possuem um aparelho antioxidante pouco eficiente, não sendo capaz de protegê-las das espécies reativas de oxigênio que atuam negativamente na peroxidação lipídica dos espermatozoides que são geradas, principalmente, pela pelo próprio metabolismo espermático (MOUSTACAS et al., 2013; PEZO et al., 2019; ROCA et al., 2006). Outros fatores também estão intrinsicamente

relacionados à baixa congelabilidade de espermática na espécie suína como, o tamanho da cabeça do espermatozoide. Uma vez que, espermatozoides suínos que possuem cabeças mais curtas e menores, estão positivamente correlacionados aos ejaculados de boa congelabilidade (VICENTE-CARRILLO, 2016). Os componentes presentes no plasma seminal dos ejaculados suínos também atuam na maior ou menor sensibilidade durante o processo de criopreservação, atuando na motilidade espermática, integridade do acrossoma, alterações semelhantes à capacitação espermática e ainda, na modulação do estresse oxidativo (PEÑA et al., 2007; ROCA et al., 2006; YESTE, 2015).

2.1.2 Protocolos para a congelação espermática em suínos

Atualmente, existem diversos protocolos para criopreservação de sêmen suíno. Porém, até o presente momento, nenhum deles foi estabelecido como protocolo-padrão. De acordo com Casas et al. (2010), Saravia; Wallgren; Rodríguez-Martínez, (2010) e Torres et al. (2016), basicamente, os passos seguidos durante a congelação espermática são: 1) Tempo de bancada: Período em que os espermatozoides do ejaculado recém coletado permanecem em contato somente com o plasma seminal homólogo durante 30 minutos em temperatura ambiente e protegidos da luz; 2) Extensão do volume com diluidores para refrigeração: O ejaculado é diluído (1:1/ v:v) em extensor de refrigeração, como por exemplo, BTS (Beltsville Thawing Solution), visando substituir o meio aquoso que era proporcionado pelo plasma seminal. Feito isso, o ejaculado diluído permanece em contato com o diluidor BTS durante 90 minutos em temperatura ambiente e sob proteção contra a luz; 3) Holding time: Período em que os espermatozoides interagem com o plasma seminal homólogo e o diluidor BTS durante 24 horas à 17 °C; 4) Centrifugação, retirada do plasma seminal e diluição com crioprotetor não penetrante: Uma centrifugação em 2400 x g por 3 minutos à 17 °C é realizada, a fim de separar o plasma seminal e o diluidor BTS das células espermáticas, ressuspende-las em um diluidor de congelação com crioprotetor não penetrante até obter-se a concentração de 1.5×10^9 espermatozoides/ mL. Esse processo é realizado, pois diversos pesquisadores já demonstraram que o plasma seminal, apesar de possuir um papel benéfico aos espermatozoides, também reduz a capacidade destes de tolerar as alterações que ocorrem ao longo do processo de criopreservação e além disso, o plasma seminal também deve ser retirado a fim de permitir o aumento da concentração das palhetas (maior quantidade de células/mL) e aumentar a relação diluidor de congelação/crioprotetor (NASCIMENTO et al.,

2008; RAVAGNANI et al., 2018). 5) Refrigeração até 5 °C ou curva positiva: As amostras diluídas são subsequentemente alojadas em um refrigerador ou bancada refrigerada, visando diminuir gradualmente a temperatura seminal, até chegarem à 5°C. Esta etapa é essencial para o sucesso da congelação, uma vez que, a diminuição drástica da temperatura somada à alta sensibilidade dos espermatozoides suínos ao choque frio poderiam lesionar irreversivelmente estas células; 6) Diluição com crioprotetor penetrante e tempo de equilíbrio: Ao atingir a temperatura de 5 °C, uma determinada quantidade de diluente com crioprotetor penetrante é adicionada aos ejaculados refrigerados até obter-se a concentração final de 1×10^9 espermatozoides/mL. Feito isso, os espermatozoides permanecerão no refrigerador por um período de 2 horas, denominado “tempo de equilíbrio”. Esta recém estabelecida etapa dos protocolos de criopreservação, promovem maior equilíbrio osmótico entre o meio intra e extracelular e resulta em uma melhor congelabilidade. Ao final desta etapa, os ejaculados são armazenados em palhetas de 0,5 mL; 7) Congelação até -120 °C ou curva negativa: As palhetas seminais são alojadas em caixa ou máquina de congelação de sêmen, de acordo com o método de criopreservação escolhido. No entanto, tanto no método manual quanto no automático, as amostras seminais terão uma drástica queda de temperatura, de 5 a -120 °C, considerando uma diminuição de 30 °C por minuto, aproximadamente; 8) Armazenamento: Após atingir a temperatura de 120 °C negativos, as palhetas seminais criopreservadas serão armazenadas em nitrogênio líquido à -196 °C, onde podem permanecer até o momento em que serão utilizadas. Estas doses podem permanecer armazenadas por um período ilimitado. No entanto, é importante saber que após 2 anos de armazenamento, ainda com correta manutenção dos botijões criogênicos, há uma redução quanto à cinética espermática, que atua diretamente relacionada ao potencial fertilizante destes (ANDRADE et al., 2019; PASSARELLI et al., 2020).

Os passos expostos acima podem ser alterados de acordo com a experiência ou necessidade do profissional que realiza o processo de criopreservação. No entanto, é necessário ter em mente que, protocolos com diminuição rápida de temperatura, podem causar danos irreversíveis ao espermatozoide suíno, devido à formação de balsas lipídicas e conseqüentemente, aumentando a permeabilidade da membrana plasmática e, perda de conteúdo celular como, ATPs, ácidos nucleicos, íons e água. Mas em contra partida, protocolos com a diminuição de temperatura excessivamente lenta, resultam na formação de cristais de gelo no meio extracelular, e estes podem causar danos físicos aos espermatozoides (VICENTE-CARRILLO, 2016). Outro ponto que deve ser esclarecido, refere-se à utilização de protocolos chamados “One step” na espécie suína. Segundo Brito et al. (2017), este

protocolo de criopreservação consiste na diluição dos espermatozoides em meio extensor com crioprotetores não penetrantes e crioprotetores penetrantes, em um mesmo momento, quando estes ainda se encontram em uma temperatura de 17 °C. Este protocolo é amplamente utilizado na espécie bovina, apresentando bons resultados pós descongelação e ainda reduz consideravelmente o período de congelação, a mão de obra e os custos envolvidos ao longo da realização deste procedimento (CELEGHINI et al., 2008; GRÖTTER et al., 2019). No entanto, quando realizado na espécie suína, os resultados foram insatisfatórios, inviabilizando completamente a utilização deste método (MONTEIRO et al., 2019). Acredita-se que as células espermáticas suínas não suportem a toxicidade conferida pelos crioprotetores penetrantes, quando em contato por um longo período, diferente dos espermatozoides bovinos que toleram muito bem esta incubação prolongada (ANDRADE et al., 2019).

2.1.3 Diluentes de congelação espermática

Durante o processo de criopreservação espermática, meios diluidores são utilizados estrategicamente visando proteger os espermatozoides de danos. Além, de fornecer substratos para que estes consigam manter a sua viabilidade, haja vista que, para a membrana plasmática permanecer íntegra, é necessário uma grande demanda energética (VICENTE-CARRILLO, 2016; YESTE, 2016). Estes extensores são classificados de acordo com a sua composição química, sendo divididos em duas categorias: Diluidores com crioprotetores não penetrantes ou com crioprotetores penetrantes. Mas, ainda que classificados em apenas duas categorias, diversos são os meios extensores disponíveis no mercado, sendo selecionados de acordo com o protocolo de congelação estabelecido ou pela necessidade do pesquisador (JOVIC et al., 2020).

Os diluentes são utilizados em momentos distintos na congelação do sêmen suíno, diferente do que se sucede em outras espécies, como em bovinos, por exemplo (CELEGHINI et al., 2008; TORRES et al., 2016, 2019). Isso ocorre, pois, o diluidor com crioprotetor penetrante é essencial para proteção dos espermatozoides ao longo da curva de congelação negativa, que submete os espermatozoides às temperaturas mais baixas no protocolo de congelação. No entanto, se adicionado antes desta etapa, estes extensores apresentam toxicidade às células espermáticas suínas e em casos de danos mais severos, resultam na morte celular (VICENTE-CARRILLO, 2016). Em geral, ambos os diluidores possuem água pura, solução tampão, substratos, antibióticos e antioxidantes. Os crioprotetores penetrantes

atuam na regulação da osmolaridade e do pH, fornecem fontes de substratos para o metabolismo espermático, evita a contaminação bacteriana e ainda, evitam a formação de cristais de gelo e o efluxo de colesterol (MOUSTACAS et al., 2013; JOVIC et al., 2020).

Fazendo referência ao seu próprio nome, os diluidores com crioprotetores não penetrantes não possuem a capacidade de atravessar a membrana plasmática do espermatozoide. Portanto, atuam somente no meio extracelular, aumentando a osmolaridade do meio durante a cristalização e facilitando a desidratação celular. Ainda, atuam formando uma espécie de filme protetor na superfície das células espermáticas, para protegê-las dos cristais de gelo e também, agem repondo os fosfolipídeos perdidos pelas membranas ao longo do processo de congelação. Em sua composição é comumente encontrado os di ou trissacarídeos, como a lactose, galactose e sacarose, e também, proteínas do leite, gema de ovo, albumina, antioxidantes e diversos outros componentes (ANDRADE et al., 2019; KNOX et al., 2015).

Referente aos extensores com crioprotetores penetrantes, a composição se assemelha muito aos não penetrantes, diferindo-se principalmente, na inclusão do glicerol. O glicerol é o crioprotetor mais utilizado, uma vez que, além de ter a habilidade de penetrar na célula espermática e manter a integridade do seu citoesqueleto, também possui alta capacidade de se ligar a água, impedindo a formação e o desenvolvimento dos cristais de gelo no meio extracelular. Em resumo, o glicerol, que é classificado como um álcool, atua regulando o equilíbrio osmótico intra e extracelular durante a congelação espermática e é capaz de se ligar diretamente aos fosfolipídeos da membrana, influenciando na sua fluidez e permeabilidade (MOUSTACAS et al., 2013).

2.1.4 A influência do indivíduo na congelabilidade espermática em suínos

A criopreservação espermática induz as células à uma situação não-fisiológica, para a qual é necessária alta capacidade de adaptação celular às alterações térmicas e osmóticas que ocorrem durante a diluição, refrigeração e criopreservação. Os espermatozoides suínos quando comparados ao de outras espécies domésticas são considerados os mais sensíveis ao choque-frio, principalmente pelas características da membrana plasmática, que nessa espécie apresenta pouco conteúdo de colesterol e fosfolipídios saturados (WATSON, 2000). 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 dos espermatozoides de diferentes ejaculados de um mesmo animal, e até mesmo entre frações de um mesmo ejaculado (HOLT et al., 2005; PEÑA et al., 2007; YESTE et al., 2013).

Por outro lado, 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 às diferenças individuais dos que ao processo de criopreservação propriamente dito (MEDRANO; HOLT; WATSON, 2009). Entretanto, as particularidades que induzem à maior criotolerância de alguns ejaculados suínos ainda permanecem pouco estudadas (CASAS et al., 2010; YESTE, 2016).

Ainda no início dos anos 2000, Thurston et al. (2002) descreveram que as variações de congelabilidade observadas entre cachaços poderiam ser determinadas geneticamente. Portanto, é conhecido que tais diferenças gênicas entre cachaços com sêmen de alta e baixa criotolerância, resultam em alterações à nível de mRNA e conseqüentemente, de proteínas (GYGI et al., 1999). Contudo, ainda não foi demonstrado que os miRNAs podem estar efetivamente associados com tais variações de congelabilidade entre diferentes cachaços.

2.1.5 Perspectivas na criopreservação do sêmen suíno

Nos últimos anos, diversas alterações foram realizadas em relação ao processo de congelação de sêmen suíno. Foi feita a retirada do plasma seminal, estabeleceram novas etapas, como o holding time e o tempo de equilíbrio, adicionaram diferentes antioxidantes e meios diluidores, utilizaram somente a fração rica do ejaculado ao invés do ejaculado total, modificando-se, por diversas vezes, o protocolo de criopreservação seminal (CASAS; ALTHOUSE, 2013; MEDRANO; HOLT; WATSON, 2009; MONTEIRO et al., 2019; PASSARELLI et al., 2020; SARAVIA; WALLGREN; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2010; TORRES et al., 2016, 2019; VICENTE-CARRILLO, 2016). No entanto, os resultados obtidos ainda eram indesejados e inviabilizavam o emprego desta importante biotecnologia a nível comercial. Sabe-se que o espermatozoide suíno é extremamente sensível ao choque frio devido às suas próprias particularidades e que também, há uma grande variabilidade de resultados após a descongelação entre ejaculados e indivíduos, o que não conferia

consistência a estes resultados (YESTE, 2016). Diante do exposto e na tentativa de solucionar esta grande problemática, alguns pesquisadores deste âmbito estão desenvolvendo pesquisas a fim de identificar os ejaculados que apresentarão boa tolerância aos desafios da criopreservação espermática, antes mesmo que este processo ocorra. Tais estudos são de cunho molecular e visam identificar biomarcadores de tolerância espermática, através do profundo estudo de miRNAs, proteínas, lipídeos e metabólicos presentes nas células espermáticas e no plasma seminal de ejaculados (DAI et al., 2019; FRASER et al., 2020; PEZO et al., 2019). Os resultados de tais pesquisas, tem se mostrado muito positivos e conferem esperança de que, uma vez por todas, a inconsistência nos resultados que inviabiliza o uso do sêmen congelado de suínos em escala comercial, possa ser, de fato, superada e a cadeia suinícola possa ser positivamente impactada, através da maior tecnificação, produtividade e rentabilidade que o emprego do sêmen congelado pode gerar (ANDRADE et al., 2019; PEDROSA et al., 2020).

2.2 O PAPEL DOS miRNAS NA ANDROLOGIA SUÍNA

2.2.1 O processo de transcrição e tradução do genoma nos espermatozoides

O processo de transcrição e tradução do genoma humano e animal é cientificamente conhecido como o Dogma Central da Biologia Molecular (CRICK, 1970), descrito há décadas e que ainda se faz presente nos dias atuais. Este trabalho trouxe à tona as respostas para as mais diversas dúvidas acerca de como o genoma dos indivíduos era expresso. Em geral, foi determinado que o DNA era composto pela informação genética, esta era transcrita em moléculas intermediárias, os RNAs, e depois traduzidas em moléculas efetoras, as proteínas.

Estas etapas estão presentes durante as diferentes fases da espermatogênese, onde ocorre ampla síntese de RNA nas espermatogônias A, com diminuição gradual deste processo até a fase de espermatogônia B e espermatócitos no princípio da prófase I. Não há síntese de RNA nas fases intermediárias de leptóteno, zigóteno e início do paquíteno. No decorrer do paquíteno e na fase inicial e intermediária de espermatócito I, ocorre aumento repentino da transcrição e, ao final desta fase, a transcrição volta a diminuir. Em células em diplóteno II e na segunda divisão meiótica, não há transcrição. Em espermatócitos II e fase inicial da

espermátide arredondada, há baixa taxa de transcrição. Ao fim da espermiogênese e em espermatozoides maduros acreditava-se que não haveria transcrição (RAUBER, 2015).

A maior parte do genoma espermático é transcrita e, antes, acreditava-se que os RNAs que não codificavam nenhuma proteína, seriam considerados remanescentes afuncionais da transcrição (CHEN et al., 2017). Porém, diversos estudos elucidaram as importantes funções desta classe de RNAs, demonstrando que eles, de fato, são imprescindíveis para o processo de transcrição e tradução das diversas células e tecidos do organismo animal e humano (CHAMPROUX et al., 2016).

2.2.2 Os transcritos dos espermatozoides

Existem três famílias de pequenos RNAs não-codificantes já descritos na literatura: miRNAs, pequenos RNAs de interferência (siRNAs) e piRNAs (piwi-like RNAs) (VOJTECH et al., 2014; YADAV; KOTAJA, 2014). Dentre estas famílias, a mais conhecida e bem estabelecida é a família dos miRNAs (CHEN et al., 2017). MiRNAs são pequenos RNAs, de 18 – 24 nucleotídeos em sua composição, não-codificantes, de fita única (quando maduros) e que regulam a expressão gênica (ANDERSON; KEDERSHA, 2009). Os miRNAs são altamente conservados entre as espécies e participam ativamente regulando as etapas da espermatogênese. Sua presença ou ausência podem ser indicativos de desenvolvimento anormal ou função espermática alterada (VOJTECH et al., 2014; YADAV; KOTAJA, 2014).

2.2.3 Biogênese e mecanismo de ação dos miRNAs na reprodução suína

Os miRNAs primários (pri-miRNAs) são moléculas constituídas de centenas a milhares de nucleotídeos em sua estrutura. Estes apresentam precursores (pré-miRNAs) de aproximadamente 70 nucleotídeos no núcleo das células eucarióticas, que são formados pela RNA polimerase II e clivados pelo complexo endonuclease Drosha. Os pré-miRNAs são transportados para o citoplasma, via Exportin 5, e são clivados pela ribonuclease Dicer, originando duas fitas de miRNAs maduros. Uma das fitas irá ser a responsável pela interferência do mRNA alvo e a outra é, usualmente, degradada. O fator determinante da função assumida por cada fita de miRNA está relacionada a maior estabilidade termodinâmica do terminal 5' de cada fita, ou seja, a mais instável sofrerá a degradação. Porém, há

evidências que confirmam que nos testículos, as duas fitas de miRNA, originadas de uma origem comum, podem ser funcionais (BARTEL, 2009; RO et al., 2007).

No citoplasma, os miRNAs maduros se associam a um complexo de proteínas argonautas e outras proteínas acessórias, formando o complexo de silenciamento induzido por miRNA (miRISC). Este complexo tem a capacidade de se ligar a qualquer mRNA alvo que apresente uma sequência complementar, e pode impedir a expressão gênica através da degradação do mRNA alvo ou impedindo sua expressão, através de um pareamento imperfeito (KOTAJA, 2014). Os miRNAs são capazes de se ligarem a centenas de mRNAs alvos, exercendo um poderoso controle de certos circuitos metabólicos controlados pela tradução destes compostos, participando até mesmo de processos patológicos no organismo (CHANDRA et al., 2017).

Diversos grupos de pesquisa conduziram experimentos com o intuito de se estabelecer perfis de miRNAs encontrados no sêmen de cachorros, e avaliaram este perfil em espermatozoides imaturos, epidídimo, sêmen *in natura*, sêmen congelado e no plasma seminal (CHEN et al., 2017; CURRY; SAFRANSKI; PRATT, 2011; LUO et al., 2015; ZHANG et al., 2017). Foram relatadas correlações entre alguns miRNAs (let-7a, -7d, -7e e miR-22) em ejaculados com morfologia espermática anormal, assim como menores níveis de miR-15b em ejaculados do grupo de menor motilidade (CURRY; SAFRANSKI; PRATT, 2011).

Zhang et al. (2015) trabalhando com sêmen *in natura* e congelado de suínos, observaram que o processo de criopreservação estimulava a expressão diferencial dos tipos let-7c, -5p, ssc-miR-26 a e ssc-miR-186 de miRNAs. Porém, os autores do trabalho concordaram que estudos diversos deveriam ser conduzidos para determinar a função da expressão diferencial destes miRNAs.

Após dois anos de pesquisas, Zhang et al. (2017) trabalharam com sêmen *in natura* e congelado e determinaram que houve up-regulation dos miRNAs let-7a, -7c, -7d, -7e, -7f, -5p, -7i, miR-9-5p, -26a, -98, -181a, -186, -212, -374a-5p, -374b-5p e down-regulation dos miRNAs miR-22 e miR-450b-5p após a descongelação. Os genes codificantes para os mRNAs alvo estão relacionados a importantes processos biológicos, funções e componentes celulares. Além disso, os autores concluíram que o congelamento do sêmen utilizando diluente contendo glicerol induziu menor expressão de fatores pró-apoptóticos no semen. Os achados sugerem que os miRNAs estão amplamente relacionados ao processo de congelamento de sêmen dos cachorros.

2.2.4 Pequenas vesículas extracelulares

Todas as células eucarióticas são capazes de secretar vesículas que possuem diferentes tamanhos e conteúdo, sendo este importante e recém-descoberto fenômeno, realizado para que as células possam se comunicar entre elas, mesmo que estejam localizadas em tecidos distantes e além disso, a fim de remover o conteúdo indesejado de seu interior (RAPOSO; STAHL, 2019; ZABOROWSKI et al., 2015). As vesículas extracelulares (VEs) podem ainda ser classificadas, principalmente, como, exossomos ou microvesículas, as quais possuem além de tamanho e conteúdo distintos, também uma biogênese diferente; haja vista que, enquanto os exossomos (< 200 nm) são gerados através da fusão da membrana plasmática com corpos multivesiculares; as microvesículas (> 200 nm) são formadas a partir da vesiculação externa da membrana plasmática (MORI et al., 2019; RAPOSO; STAHL, 2019). No que diz respeito ao conteúdo liberado pelas VEs, pode-se encontrar proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e até mesmo, receptores de membrana, provenientes de suas células de origem. Uma vez que as VEs são liberadas no espaço extracelular, transportam-se através dos fluidos corporais até encontrarem as células-alvo, onde transferem o seu conteúdo e a partir disto, contribuem positivamente ou negativamente em diversos processos biológicos (ZABOROWSKI et al., 2015).

Sabe-se que há mais de duas décadas, que as VEs atuam como sinalizadoras da comunicação intracelular e isto ocorreu através da descoberta de que células do sistema imune adquiriram antígenos, que foram transferidos por meio destas importantes vesículas. No entanto, somente recentemente tornou-se conhecido que os exossomos contém e são capazes de transferir mRNA e RNA não-codificantes, como os miRNAs, para células-alvo (RAPOSO; STAHL, 2019). O perfil destas moléculas encontradas dentro dos exossomos depende de qual tecido celular são oriundas e também, do estado metabólico em que a célula se encontra no momento em que são secretadas, porém, de qualquer modo, além de atuarem na comunicação intracelular, também agem na regulação gênica (ABELS; BREAKEFIELD, 2016; GROOT; LEE, 2020).

As VEs podem ser encontradas em todos os fluidos corporais, incluindo no plasma seminal e por isso, podem interagir com os espermatozoides mesmo depois da espermição, podendo exercer influência desde à motilidade até a capacitação espermática. Portanto, pode-se afirmar que os exossomos atuam diretamente sobre a qualidade do sêmen (COUMANS et al., 2017; MURDICA et al., 2019). Em suínos, os exossomos atuam não somente sobre a

motilidade espermática e a habilidade de se capacitarem, mas também, diretamente sobre a integridade da membrana plasmática, haja vista que, os exossomos são capazes de se ligarem a membrana que recobre a cabeça dos espermatozoides (DU et al., 2016). Portanto, fica claro a relevância que estas moléculas e seu conteúdo podem exercer sobre a qualidade seminal nesta espécie.

3 HIPÓTESE

O perfil de miRNAs tanto em células espermáticas quanto em VEs oriundas do plasma seminal de ejaculados suínos *in natura* difere entre ejaculados que possui alta e baixa congelabilidade. E deste modo, através do uso destas moléculas pode-se prever se um ejaculado possuirá alta qualidade pós-descongelação antes mesmo de ser submetido ao processo de criopreservação.

Figura 1 – Modelo hipotético gráfico



Fonte: (PEDROSA, A.C., 2020.)

4 OBJETIVOS

- Identificar o perfil de miRNAs com abundância distinta entre células espermáticas e vesículas extracelulares oriundas do plasma seminal de ejaculados com diferente tolerância ao processo de criopreservação;
- Verificar se os miRNAs podem ser utilizados como biomarcadores de criotolerância seminal em ejaculados ainda *in natura*.

5 ARTIGO CIENTÍFICO

Spermatozoa and seminal plasma small extracellular vesicles miRNAs as biomarkers of boar semen cryotolerance

Ana Carolina Pedrosa¹; Mariana A. Torres¹; Diego V. Alkmin²; Jorge E. P. Pinzon³; Simone Maria M. K. Martins⁴; Juliano C. da Silveira³; André F. C. Andrade^{1*}

¹ *Department of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, Pirassununga, São Paulo, Brazil*

² *DB swine genetics, Patos de Minas, Minas Gerais, Brazil*

³ *Department of Veterinary Medicine, Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, São Paulo, Brazil*

⁴ *Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, São Paulo, Brazil*

* Correspondent authors:

André F. C. de Andrade

Department of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, São Paulo, 05508-270, Brazil.

E-mail: andrefc@usp.br

Key-words: Cryopreservation, spermatogenesis, spermatozoa, boar, swine

ABSTRACT

Freeze boar semen is still the biggest challenge for the swine industry due to the high cold shock sensitivity of boar sperm cells and the variance of post-thaw results among individuals and ejaculates from the same boar. To solve this problem, we investigate if miRNAs present in sperm cells and small extracellular vesicles (EVs) from seminal plasma of raw boar ejaculates can predict high-quality ejaculates after underwent the freeze-thaw process. For this, we obtained miRNAs samples of sperm cells and EVs from raw seminal plasma from 27 ejaculates before the cryopreservation process. Two groups with different freezability considering the analysis post-thaw of structure and sperm functionality were formed: High freezability (HF; n=04) and low freezability (LF; n=04). That done, we investigated the miRNAs profile of sperm cells and EVs from seminal plasma in both groups. Three miRNAs were differently abundant in LF ejaculates, being the ssc-miR-503 found in higher levels in sperm cells. The ssc-miR-130a and ssc-miR-9 most abundant in EVs from seminal plasma ($P < 0.10$). Through enrichment analysis, it was possible to verify that these miRNAs could be performing modifications in the development of male germ cells and in the production of energy to spermatozoa to maintain their viability and functionality. Therefore, we can demonstrate that ssc-miR-503, ssc-miR-130a, and ssc-miR-9 are related to low sperm cryotolerance in boars semen. So those miRNAs can be used as a biomarker to predict their low ability to tolerate the cryopreservation process.

1. Introduction

Cryopreservation is the most efficient method to preserve genetic material for long-term storage in domestic and wild animals [1]. However, the damage of boar spermatozoa by that process is most severe than in other animal species, making sperm cryopreservation a big challenge for swine [2], which explains why only 1% of all AIs are done with cryopreserved boar semen in different genetic centers around the world [3].

Cryodamage are intensely severe in boar sperm cells due to their high cold shock sensitivity resulting in low survivability rates (60-50%) during the freezing-thawed process and, maybe the causes of lower fertility rates, a decreased farrowing rates, and smaller litter sizes [4,5]. Another setback regarding sperm cryopreservation in boars is the variance between individuals as ejaculates from the same boar, typically described as "different freezability or cryotolerance" [6–8]. These different freezabilities condition post-thaw occurs with ejaculates with high quality in raw or post-holding time condition, demonstrating that the quality before the cryopreservation process can not directly influence their post-thaw quality [9].

In order to solve this challenge and increase the use of frozen boar semen in the pig industry, most research in this field has focused on conducting molecular analysis of boar sperm and seminal plasma components, such as transcriptome [10], metabolome [11], proteome [12], and lipidome [13] studies. Regarding RNA molecules, non-coding RNAs such as miRNAs are important molecules that could influence boar sperm quality since they regulate mRNAs and thus different biological processes. The miRNAs are endogenous 23 nucleotides RNAs that play essential gene-regulatory roles in animals and plants by pairing to target-mRNAs of protein-coding genes leading to direct posttranscriptional repression [14]. Additionally, besides cell cytoplasm, these non-coding RNAs can be found in biological fluids, such as blood, urine, saliva, and semen, into extracellular vesicles (EVs) [15,16]. Extracellular vesicles are cell-secreted vesicles involved in cell-cell communication and can participate in several cellular processes due to their bioactive contents, including the miRNAs [17].

Since small RNAs are directly related to male reproduction, playing roles in the development of Sertoli cells [18], spermatogonial stem cells [19], spermatogenesis [20], sperm maturation [21], until fertilization [22], as well as influencing sperm quality parameters and cryotolerance [23]. Despite that, the miRNAs have not been used as a tool to predict the boar freezability before the cryopreservation process. Therefore, the current study's main goal

was to determine if miRNAs present in sperm cells and EVs from seminal plasma boar ejaculates can predict if high-quality ejaculates would have good quality after undergoing the freeze-thaw process. Based on the results, we demonstrated that miRNAs could be utilized as biomarkers of low spermatocryotolerance in boars.

2. Material and methods

2.1 Ethics statement

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 3756081018. All animal procedures are performed according to legal and ethical standards.

2.2 Experimental design

The study was performed as a randomized design in which each ejaculate was considered an experimental unit. We investigate if miRNAs from spermatozoa and extracellular vesicles (EVs) present in seminal plasma from raw boar ejaculates are related to sperm tolerance to cold-shock during the cryopreservation process; also, if it can be used as a biomarker predictor of sperm cryotolerance in boars. Samples for evaluation of miRNAs present in seminal plasma, as well as in spermatozoa, were collected before adding any semen extender. For this experiment, 27 boars' ejaculates were collected, evaluated, and cryopreserved. Each ejaculated sample of seminal plasma and spermatozoa was obtained in duplicates for investigation of miRNAs profile. After the frozen-thawed process of 27 boars' ejaculates, two groups with different freezability were determined (LF = Low Freezability and HF = High Freezability; n = 04 in each them) through sperm assessment data using weighting averages considering cells simultaneously with the integrity of plasma and acrosomal membranes (IPIA) the most important variable. Thus, to confirm that the selected samples differed between the groups, an analysis of variance (ANOVA) was performed using the *Statistical Analysis System - SAS* software (v. 9.3), considering 5% significance. miRNAs profile of spermatozoa and EVs from seminal plasma samples from each experimental group were obtained through isolation of EVs from seminal plasma, RNA extraction from sperm cells and EVs, RT-PCR analysis, statistical and bioinformatics analysis.

2.3 Boars, semen collection, and raw sperm assessment

Twenty-seven healthy boars (Large White, n = 12 and Landrace, n = 15), sexually mature (between 9 to 30 months old) with proven fertility were semen donors in this experiment (one Sperm Rich Fraction [SRF] each; n = 27). These boars were housed in a commercial genetics diffusion unit (DB Swine Genetics – DanBred, Patos de Minas, Brazil) under the same food management and environmental conditions. Sperm collections were performed manually using the gloved-hand method and considering specifically only the SRF. All ejaculates before freezing met high sperm quality requirements, specifically more than 75% and 80% of spermatozoa displaying normal motility and morphology, respectively. After sperm collection, each ejaculate was held at room temperature (25 °C) for 30 min in its seminal plasma and without any extensor [24]. Raw sperm assessment was measured by volume (mL), spermatozoa concentration (Neubauer chamber), total and progressive motility (AndroVision[®] - Minitube, Tiefenbach, Germany), and morphology (differential interference contrast microscopy – DIC; Nikon[®], Eclipse Ni-U 80i, Tokyo, Japan). The plasma membrane was evaluated using the Eosin-nigrosine technique according to Barth; Oko (1989), and the acrosome integrity was analyzed using 6 uL fast-green/Bengal-rose for 3 min. The 27 ejaculates were extended 1:1 (v:v) in Beltsville Thawing Solution (BTS[®] – Minitube, Tiefenbach, Germany) and cooled at 17 °C for 24 hours of holding time [26].

2.4 Samples collection for miRNAs analyses

After raw semen evaluation, samples of 2 mL from each ejaculate were obtained to isolate spermatozoa from seminal plasma to further analyze miRNAs. To obtain spermatozoa samples without somatic cells and seminal plasma, we performed single centrifugation at 25 °C in 800 x g for 10 min. For EVs from seminal plasma, two centrifugations were performed at 25 °C with two washes in D-PBS (Dulbecco's Phosphate-buffered saline), the first one at 800 x g for 10 min and the second in 2000 x g for 10 min of centrifugation [27]. After this, samples were frozen in -196°C until further use. To evaluate if sperm samples were free of somatic cells, quality control was applied through a duplicate smear in slides stained in fast panoptic according to the Romanowsky method and evaluated by phase-contrast microscopy (Nikon, Model Eclipse E200, Tokyo, Japan) with 100x magnification. Five fields were evaluated, 500 cells were counted, and none somatic cells were found. Finally, spermatozoa and EVs from seminal plasma samples were stored at -196°C until further use.

2.5 Post-holding sperm evaluation

There were performed post-holding time sperm analyses to ensure the high quality of boars' ejaculates before the cryopreservation process and confirm that post-thaw sperm quality does not relate to the raw or post-holding condition. Similarly, in raw sperm assessment, we performed total and progressive motility analyses (AndroVision[®] - Minitube, Tiefenbach, Germany) as well as intact plasma and acrosome membrane evaluation.

2.6 Sperm cryopreservation and semen thawing

Extended sperm samples were frozen based on the straw freezing protocol described by Baishya et al. (2014). Briefly, after holding time, the seminal samples were centrifuged at 2200 x g for 3 min, and the supernatant was removed by aspiration. Sperm was extended to obtain a concentration of 1.5×10^9 spermatozoa/ mL in freezing extender Botu-Sui[®] fraction A (FA; Sugars, amino acids, buffers, 20% egg yolk (v:v) and antibiotics - Biotech Botucatu, Botucatu, Brazil) and cooled to 5 °C for 120 min. Subsequently, the freezing extender Botu-Sui[®] fraction B (FB; composed of FA with 6% glycerol and 6% methylformamide (v:v) was added to obtain the 1×10^9 spermatozoa/ mL, and then, it were stored in 0.5 mL straws at 5 °C (IMV Technologies, L'Aigle, France). After that, straws were cryopreserved at 3 cm above liquid nitrogen level in a thermal box considering a freezing rate of -20 °C/min from 5 to -120 °C. Finally, the straws were immersed in liquid nitrogen at -196 °C. After the cryopreservation process, all straws were stored in liquid nitrogen for at least a week before thawing. Two straws per ejaculate were thawed in a water bath at 37 °C for 30 s, before sperm analyses. Thawed semen was extended according to the seminal analysis performed. Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA, Sperm Class Analyzer, SCA[®], Microoptics - Barcelona, Spain) was performed to obtain sperm kinetics measures, extending samples in FA to obtain 30×10^6 spermatozoa/ mL. Flow cytometer analysis was performed after semen extension in Tyrode's albumin lactate pyruvate (TALP) sperm medium to 2.5×10^6 spermatozoa/ mL.

2.7 Post-thaw sperm evaluation

2.7.1 Computer-assisted sperm analysis (CASA)

Regarding post-thaw sperm kinetic analyses, attributes were considered as total (TM) and progressive (PM) motility, curvilinear velocity (VCL); straight-line velocity (VSL); average path velocity (VAP); percentages of linearity (LIN), straightness (STR), the

amplitude of lateral head displacement (ALH) and, beat cross frequency (BCF). Spermatic hyperactivation was analyzed considering the values for the amplitude of lateral head displacement (ALH; $> 3.5 \mu\text{m}$) and curvilinear velocity (VCL; $> 97 \mu\text{m/s}$) [29]. These evaluations were performed using CASA (Sperm Class Analyzer, SCA[®], Microptics - Barcelona, Spain) with a pre-warmed Makler-chamber and evaluated by phase-contrast microscopy (Nikon, Model Eclipse 80i, Tokyo, Japan) with 100 \times magnification, considering five good fields. Total sperm motility was defined as the percentage of spermatozoa with a VCL greater than $10 \mu\text{m/s}$, and progressive sperm motility was defined as the percentage of spermatozoa with an STR greater than 45 %. Rapid cells were defined as spermatozoa with a VAP greater than $45 \mu\text{m/s}$.

2.7.2 Sperm membranes analyses

Sperm membranes condition was evaluated using the flow cytometry analysis [26,30]. Attributes such as the intact plasma and acrosome integrity (IPIA), fluidity of the sperm membrane, mitochondrial membrane potential, lipid peroxidation (both evaluated in intact plasma membrane cells) and oxidative stress were examined. Briefly, these analyses were performed with Accuri C6[®] flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, United States) considering an acquisition rate of about 600 to 1000 events/s, acquiring 10.000 S59-positive events (Syto 59, Molecular Probes, Eugene, United States). The cells were excited by an argon laser at 488 nm and by a red laser at 640 nm and, the detectors used was FL1 (530/30 nm) to *Pisum sativum* agglutinin conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC-PSA, Sigma Aldrich - Saint Louis, United States), C11-BODIPY581/591 (BPY, Molecular Probes, Eugene, United States) (green fluorescence) and YO-PRO[™]-1 iodide (YoPro, Molecular Probes, Eugene, United States); FL2 (585/40 nm) to 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1, Molecular Probes, Eugene, United States) (orange fluorescence) and Merocyanine 540 (M540, Molecular Probes, Eugene, United States); FL3 (610/20 nm) to Propidium Iodide (PI, Sigma Aldrich - Saint Louis, United States) and, FL4 (675/25 nm) to S59. The percentage of sperm cells with simultaneous plasma and acrosome membranes' integrity was evaluated using PI, FITC-PSA, and S59 probes. To evaluate the fluidity of the sperm membrane was used YoPro and M540 probes, and then the intact plasma membrane cells (only YoPro negative) were considered. Subsequently, sperm cells were stained with JC-1, PI, and S59 probes to examine the percentage of viable cells (PI negative) with high mitochondrial potential. Finally, the BP probe was used to evaluate the lipid peroxidation of sperm cells and, the incubation with dihydroethidium (DHE, Molecular

Probes, Eugene, United States) probe was performed to obtain the rate of sperm oxidative stress.

2.8 Determination of samples with different freezability phenotypes

In order to establish a closed-loop phenotype-miRNA-target research model, we determined different freezability phenotypes groups. Boar ejaculates were selected from the post-thaw attributes of the total motility (TM), and intact plasma and acrosome integrity (IPIA) obtained through CASA and flow cytometry, respectively. Four ejaculates formed each group following a cut score. HF group only includes ejaculates with TM >30% and IPIA >40%. In contrast, LF experimental group was formed by ejaculates with TM <20% and IPIA <25%. These sperm characteristics were chosen because they are the most affected by damage during sperm cryopreservation in boars, according to Yeste (2016).

2.8.1 Separation of EVs from seminal plasma

EVs from the seminal plasma from samples of low freezability group (n = 4) and high freezability group (n = 4) were thawed and after this, all them were centrifugated at 25 °C (16,500 x g for 30 minutes) and filtered through a 0.20-µm sterile syringe filter (PES membrane; São José dos Pinhais, Brazil) to remove the large EVs. In this same process, the 250 µL of samples from seminal plasma enriched with EVs was diluted in 2750 µL of Phosphate Buffered Saline (PBS; 1× Ca²⁺/Mg²⁺ free PBS; 137-mM NaCl, 2.7-mM KCl, 10-mM Na₂HPO₄, and 2-mM KH₂PO₄) [27]. After that, samples were centrifuged twice at 34 100 × g for 70 minutes at 4° C (Optima XE-90 ultracentrifuge; rotor 70 Ti - Beckman Coulter, Brea, United States) in order to obtain small EVs as previously described [31]. Finally, the supernatant was removed, and the pellets enriched with small EVs were resuspended in 100 mL of PBS. Samples were stored at -80°C until further use.

2.8.2 Characterization of extracellular vesicles separated from seminal plasma

EVs separated from seminal plasma were characterized based on their particle size and concentration, which was determined using nanoparticle tracking analysis (NTA), and their specific proteins were characterized by western blotting [32].

2.8.3 Nanoparticle Tracking Analysis

For these analyses, EVs separated from both groups' seminal plasma samples were resuspended in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ free PBS. The dilution factor of the EVs samples varied according to their concentration. Particle size and concentrations were measured using Nanosight (NS300; NTA 3.2 scripting, Malvern, United Kingdom), and the analysis was performed by capturing five videos of 30 seconds each, using a scientific CMOS camera set at level 13 and threshold of 5 under a controlled temperature of 37 °C.

2.8.4 Western blotting analysis

The protein lysate from spermatic cells and EVs was obtained using RIPA buffer and proteinase inhibitor cocktail. Laemmli and beta- AQ4 mercaptoethanol 4× (Bio-rad, Hercules, United States) was added in 6.7 μL of protein solution. Denaturation of the proteins was accomplished by transferring the samples to 95 °C for 5 min. They were then loaded into SDS-PAGE 10% polyacrylamide gel (456–1033; Mini-PROTEAN TGX; Bio-rad, Hercules, United States). The gel was run at 100 V for about 150 minutes, and then the proteins were transferred onto a PVDF membrane (1704156; Trans-Blot Turbo; Bio-rad, Hercules, United States). The membrane was washed in 1× Tris-buffered saline with Tween-20 (TBST) and maintained in a blocking buffer (5% of bovine serum albumin (BSA) in TBST) at room temperature for 1 hour. After that, the membrane was incubated overnight with a primary antibody at 4 °C. The proteins α -tubulin (~50 kDa) and ALIX (95 kDa) were evaluated using a mouse monoclonal antibody raised against human osteosarcoma and in breast cancer cell line (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; T9026; Sigma Aldrich, Saint Louis, United States) and a goat polyclonal antibody raised against a peptide mapping at the N-terminus of Alix of human origin (0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; SC-49267; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), respectively. After incubation, the membrane was washed three times using 1× TBST for 5 minutes each time and then incubated with secondary antibody antimouse (1:4000; #7076S; Cell Signaling Technology, Danvers, United States) and antigoat (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; SC-2020; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) conjugates in horseradish peroxidase for 1 hour at room temperature. Finally, the membrane was washed three times using 1× TBST and exposed to a detection solution (170–5060; Clarity Western ECL; Bio-Rad, Hercules, United States). The images were obtained, and analysis was performed using the ChemiDoc MP Image System (Bio-Rad, Hercules, United States).

2.8.5 RNA extraction of EVs from seminal plasma

The RNA from EVs was isolated using TRIzol[®] reagent (Invitrogen - Carlsbad, United States) according to the manufacturer's instructions with few modifications. Briefly, EVs lysis was performed using 1 mL of TRIzol[®] (Invitrogen - Carlsbad, United States) and was 200 μ L of chloroform (Invitrogen, Carlsbad, United States). The first centrifugation occurred at 4 °C in 12,000 x g for 15 minutes and after this, was added on EVs sample 1.33 μ L of GlycoBlue[®] (Invitrogen, Carlsbad, United States) to maintain RNA integrity. After that, it was added 700 μ L of isopropanol alcohol and another centrifugation at 4 °C in 20,000 x g for 30 minutes was performed. Done that, was added 1 mL alcohol 75% to the sample before last centrifugation at 4 °C in 20,000 x g for 5 minutes. Finally, the total RNA was resuspended in water and analyzed for its quality and concentration using spectrometry (NanoDrop 2000; Thermo Fisher Scientific, Maryland, United States). All RNA purified was treated with DNaseI (Invitrogen, Carlsbad, United States).

2.8.6 RNA extraction of spermatozoa

According to the manufacturer's instructions, the protocol adopted for extraction and purification of total RNA from boar spermatozoa occurs using TRIzol[®] reagent (Invitrogen - Carlsbad, United States). Briefly, the raw spermatozoa samples collected and stored in a cryogenic cylinder have been thawed in 4 °C and, after that, was added 300 μ L of Ca²⁺/Mg²⁺-free PBS to dilute the spermatozoa pellets which highly concentrated. Before the RNA extraction is done, the lysis of sperm cells was performed using 8 μ L polyacrilyl and 750 μ L of TRIzol[®] (Invitrogen, Carlsbad, United States), and after this, the separation phasis occurred using 200 μ L of chloroform (Invitrogen, Carlsbad, United States) and with centrifugation at 4 °C in 12,000 x g for 30 minutes. The RNA extraction of spermatozoa samples was performed using 500 μ L isopropanol alcohol and one first centrifugation at 4 °C in 20,000 x g for 30 minutes. Done that, was added 1 mL alcohol 75% e after this, twice centrifugation was performed at 4 °C in 12 000 x g for 5 minutes, discarding the supernatant between them. Finally, RNA quality and concentration were analyzed using spectrometry (NanoDrop 2000; Thermo Fisher Scientific, Maryland, United States), and all RNA samples were treated with DNaseI (Invitrogen, Carlsbad, United States).

2.8.7 Reverse transcription for cDNA synthesis

For cDNA synthesis, reverse transcription was performed using the commercial miScript[®] II RT Kit (Qiagen, Hilden, Germany) with the 5x miScript HiFlex Buffer to obtain

the total miRNAs, according to the manufacturer's instructions. Briefly, reactions of 10 μ l were made up of 200 ng of total RNA, 2 μ l of 5x HiFlex Buffer, 1 μ l of 10x nucleic acid mix and also, 1 μ l of reverse transcriptase enzyme. Subsequently, the reverse transcription reactions were conducted in a thermocycler (Life Technology - Carlsband, United States), where they remained at 37 °C for 60 minutes followed by 95 °C for 5 minutes as previously used by De Ávila et al. (2020).

2.8.8 RT-PCR analysis of miRNAs from spermatozoa and Extracellular Vesicles

Were analyzed all miRNAs found in pig species totaling 383 miRNAs in spermatozoa samples and EVs from seminal plasma samples, through reverse transcription and quantitative RT-PCR analysis, which were performed with the commercial kit miScript SYBR[®] Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the reactions performed had a total volume of 6 μ L and were composed by 3 μ L 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 0.6 μ L of 10x miScript Universal Primer, 1.37 μ L of RNase-free water, 0.03 μ L of cDNA, and 1 μ L of 10 μ M specific forward primer as previously used by De Ávila et al. (2020). Primers used as specific forward were designed based on pig mature miRNAs sequences found at the miRBase database (Supplemental table 1). Amplifications were performed on QuantStudio[™] 6 Flex (Thermo Fisher Scientific, Maryland, United States) equipment. For this, the reactions were used the polymerase DNA enzyme activation with an initial incubation of 95 °C/15 minutes and 45 cycles of 94 °C/15 seconds, 55 °C/30 seconds, and 70 °C/30 seconds. To confirm the amplification efficiency performed just were considered present, the miRNAs who demonstrated cycle threshold (CT) was less than 37 cycles in all samples in the experimental group (LF = 04 and HF = 04) and the presence of adequate melting curves. The CT was normalized using the CT of miR-99b as previously used in Alves (2019). Normalized data is presented as $2^{-\Delta Ct}$ and \pm SEM.

2.8.9 Spermatozoa and EVs from seminal plasma miRNAs levels

MiRNAs described as differently abundant ($P < 0.10$) between LF and HF groups were analyzed through bioinformatics analysis using mirPath v.3 software from the DIANA TOOLS platform. The miRNA from spermatozoa was analyzed using micro-CDS v5.0 databases, and the miRNAs from EVs of seminal plasma were analyzed using TarBase v7.0 databases according to Da Silveira et al.(2018). To perform bioinformatics analysis, we used

human data due to the absence of pig data, were used only pig miRNAs had high homology $\geq 95\%$ in human sequences, and this homology was evaluated through the miRbase database. Also, miRNAs presenting differences in the seed sequences between pigs and humans were discarded [34].

2.9 Statistical analysis

Relative expression of miRNAs in spermatozoa samples and EVs from the seminal plasma of groups with different freezability followed the normality criteria, and their average was compared using the Student t-test considering a significance level of 5%. These analyses were performed using the JMP software from SAS. Normalized data were transformed in $2^{-\Delta CT} \pm SEM$ as shown in tables, graphics, and Venn Diagram.

3. Results

3.1 Determination of different phenotypic freezability groups

Considering the post-thaw TM and IPIA attributes, we established two different freezability groups: High freezability (HF) and Low Freezability (LF). Each group was formed by four ejaculates following a cut score. HF group only included ejaculates with TM $> 30\%$ and IPIA $> 40\%$. In contrast, LF experimental group was formed by ejaculates with TM $< 20\%$ and IPIA $< 25\%$. We determined the experimental groups as different phenotypes of freezability (P < 0.05).

3.2 Raw and post-holding time sperm evaluation

Results of raw and post-holding time sperm assessment of selected ejaculates (n = 08) are described in Table 1. These results demonstrated that all ejaculates presented high quality both in raw as post-holding time sperm assessment since there was no statistical difference (P > 0.05) among the ejaculates, which would be posteriorly selected to the HF and LF phenotype groups. Therefore, we can affirm the raw spermatic quality or post-holding did not influence different post-thawing conditions among ejaculates with high or low freezability.

3.3 Post-thaw sperm evaluation

The post-thaw results demonstrated the low ability of boar spermatozoa to support the cold damages through the high decrease in sperm assessment results compared to raw and post-holding results demonstrating the lower tolerance of the LF boar ejaculates to the

cryopreservation process. In the boars, high freezability were observed greater values for sperm kinematics post-thaw (TM, PM, VCL, and VSL) in comparison with low freezability ($P < 0.05$, Table 2). For the other characteristics of sperm kinematics, both the groups showed similar results ($P > 0.05$, Table 2).

Concerning boars sperm membranes post-thaw, the high freezability group showed greater values for IP, IPIA, and MP in comparison with low freezability ($P < 0.05$, Table 3). For the other characteristics of the sperm membrane, both the groups showed similar results ($P > 0.05$, Table 3).

The cryopreservation process is aggressive and harmful to boar sperm regardless of the HF or LF freezability group, as verified by the intense decrease of sperm viability and motility concerning raw and post-holding sperm assessment. However, the difference in freezing tolerance of ejaculates with low freezability compared to HF ejaculates is evident. Altogether, these results demonstrated our efficiency to determine two different freezability phenotypes, thus allowing further analysis towards the understanding of the phenotype-miRNA-target in our proposed research model.

3.4 Characterization of extracellular vesicles separated from seminal plasma

Characterization of EVs from seminal plasma was performed using nanoparticle tracking analysis (NTA) to investigate particle size (nm) and concentration (particles/mL) demonstrated no statistical difference. Extracellular vesicle particle sizes were between 120-140 nm, similar to previous reports evaluating pig seminal plasma Barranco et al. (2020). EVs mean size observed was 103.2 ± 3.2 nm for HF and 110.7 ± 10.8 nm for LF. Regarding EVs concentration HF presented in average $1.79 \times 10^{11} \pm 5.12 \times 10^{10}$ particles/ mL while LF $5.17 \times 10^{10} \pm 2.09 \times 10^{10}$ particles/mL groups (Figure 1).

We also performed western blot analysis in order to evaluate the presence of recommended endosome protein marker. Our results demonstrate ALIX presence in EVs and sperm cells and the presence of α -tubulin only in sperm cells (Figure 2). While ALIX can be found in EVs or cells, the α -tubulin is only detected in microtubules from sperm flagellum. These results demonstrate that EVs separation by ultracentrifugation is within the recommended parameters validating EVs' presence and the absence of sperm cell contamination in EVs pellet.

3.5 miRNAs levels in Spermatozoa and EVs from seminal plasma

To evaluate the miRNA's levels in boar spermatozoa, 383 miRNAs were evaluated in raw sperm cells from HF and LF sperm samples. A total of 258 miRNAs were detected in both experimental groups. However, one miRNA (ssc-miR-484) was exclusively found in all spermatozoa samples from the HF group (Figure 3), but the scc-miR-484 did not show a consistent homology (> 90%) with human species it cannot be selected and further investigate using available bioinformatics software. Among 258 miRNAs, only one miRNA (ssc-miR-503) presented different relative levels between HF and LF considering a P-value <0.10 (Figure 4), being more abundant in sperm cells from LF boars ejaculates. The pig miRNA sequence for miR-503 showed high homology with human species (95%).

However, regarding EVs from seminal plasma, only 54 miRNAs were detected in a panel of 383 miRNAs evaluated, a much smaller number than found in sperm cells, and none miRNA was exclusively found between the groups (Figure 5). Among these 54 miRNAs, two miRNAs (ssc-miR-130a and ssc-miR-9) showed different relative levels between EVs samples from HF and LF boars ejaculates with a P-value <0.10 (Figure 6), and these were more abundant in the LF group, similarly to observed in miRNA results from the sperm cells. Both boars miRNAs found presented high homology ($\geq 95\%$).

3.6 Enrichment analysis of miRNAs differently abundant in LF boars sperm

To obtain a better understanding of the altered miRNAs' regulatory pattern in the LF group, we performed KEGG pathway enrichment analyses. For pathway analyses, we used the functional tool from DIANA TOOLS mirPath v.3 software. Biological pathways were selected and investigated according to their relevance in sperm structure and function to establish a closed-loop phenotype-miRNA-target research model. Due to the absence of the *sus scrofa* database, analyses were performed considering human sequences once all the differently abundant boar's miRNAs in sperm cells and EVs were highly homologous to human miRNAs ($\geq 95\%$). The miR-503 found in spermatozoa samples was evaluated using the microT- CDS v5.0 database and, miR-130a and miR-9 of EVs from seminal plasma were investigated simultaneously using the TarBase v7.0 database. It was considered False Discovery Rate (FDR) correction for p-value (<0.05) as described by Benjamini and Hochberg (1995).

The miR-503 found increased in boar sperm cells from ejaculates with low freezability was predicted to be involved in 16 pathways, possibly modulating 276 genes. Among these are pathways important for cryotolerance of boars spermatozoa as Signaling Pathways

Regulating Pluripotency of Stem Cells (11 genes) as TFG-beta signaling pathway; PI3-AKT signaling pathway; WNT signaling pathway and other important pathways which are described in Figure 7.

The main genes modulated by miR-503 are involved in sperm membrane integrity and fluidity, mitochondrial membrane potential, proteins responsible for discarding defective sperm cells, cell proliferation, migration, and survival, thus suggesting a high relationship between these miRNAs and spermatozoa tolerance to cold shock.

Similarly, miR-130a and miR-9 increased in seminal plasma EVs from low freezability boars ejaculates were predicted by bioinformatics analyses as possibly involved modulating 40 signaling pathways and about 2400 genes. Among them, several genes are involved with sperm membrane integrity and fluidity, and energy production, which is directly involved with sperm capacity to move and maintain its structure. In summary, we identified pathways such as Fatty Acid Biosynthesis (3 genes) and Lysine Degradation (12 genes), and many others described in Figure 8. It is important to remember that these attributes are interconnected with the sperm's ability to tolerate the cryopreservation process. The number of genes modulated by EVs miRNAs separated from boar seminal plasma was highly superior to the numbers found in sperm cells.

4. Discussion

To our knowledge, this is the first study investigating the role of spermatozoa miRNAs and small EVs from seminal plasma obtained from raw boar ejaculates acting as biomarkers of sperm cryotolerance. We hypothesized that miRNAs abundance is different in ejaculates with high and low freezability before the freezing process. These results can be significant for the swine industry since it can choose the high freezability ejaculates before the cryopreservation process, enabling the production of cryopreserved sperm on a commercial-scale. All differently abundant miRNAs were increased in ejaculates with low freezability leading us to believe that the miRNAs present in sperm cells and EVs from seminal plasma can be involved in low sperm cryotolerance possible harmful modulation of important pathways related to sperm development or energy production. Possibly, this is the first description of altered miR-503 abundance in boar spermatozoa, comparing LF and HF ejaculates. Differently, miR-130a and miR-9 identified in EVs from the seminal plasma of the LF group were previously described in extracellular vesicles [36–38] and spermatogenesis

[39,40], but never were reported in seminal plasma. Thus, all the altered abundance miRNAs were never related to cryotolerance in boars.

The ssc-miR-503 found in spermatozoa from raw samples of boar ejaculates with low freezability is predicted to modulate genes from the suppression of cell cycle progression and differentiation, proliferation, and cell survival during male germ cells development [41]. Regarding ssc-miR-130a and ssc-miR-9 found in EVs from seminal plasma, it is suggested that they can play an essential role in sperm cryotolerance once they are predicted to be involved in pathways related to the sperm membrane integrity and in the energy production for the spermatid cells.

KEGG pathway enrichment analysis for miRNA-503 from sperm cells predicted the modulation of Signaling Pathways Regulating Pluripotency of Stem Cells ($p < 1.7E-06$) as well as several other important biological pathways mainly related to regulating Sertoli cell dynamics as Transforming Growth Factor- β (TGF- β), Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) and Phosphoinositide 3-kinase/ Protein kinase B (PI3K-AKT), which can negatively impact the sperm tolerance to cold shock. The members of the TGF- β superfamily are responsible for sending signals from cell membrane to nuclei, and through this action, they regulate distinct points of male gamete development in fetal testis, which is critical for the establishment of normal spermatogenesis [42–44]. The total or partial absence of the TGF- β superfamily factors results in smaller testis size, reduced sperm production, and can alter Sertoli cell proliferation and tight and adherens junction dynamics [45].

Furthermore, Extracellular Signal-Regulated Kinases (ERKs) playing an essential role in the development, differentiation, proliferation, survival, migration, and growth of sperm cells in the fetal testis, where this kinase influences the normal production of functionally normal spermatozoa, and its abnormal signaling could result in developmental of reproductive disorders and diseases [46,47]. In this way, the ERK1/2 is the critical mediator for intracellular calcium (Ca^{2+}) transport to sperm cell and, if this transport is inefficient, there will be a breakdown of the Ca^{2+} homeostasis in the spermatozoa, affecting the sperm damage suffered during the cryopreservation process and leading to sperm cell decrease viability [48–50]. The negative modulation of the FGF2 ligand, which is localized to the acrosomal region and spermatid flagellum, results in the inactivation of the ERK gene, and consequently, the PI3K-AKT signaling pathway is activated by intracellular calcium mediation in testis [51,52]. The PI3K-AKT pathway is one more intracellular pathway regulating the boar sperm viability since it contains two genes involved in cellular integrity as PI3 kinase (PI3K) and its target

protein kinase B (PKB/AKT) [53]. The activation of these genes prevents the apoptotic-like changes leading to spermatozoa death, but the inhibition results in decreased sperm motility and velocity leading to reduced plasma membrane integrity and mitochondrial membrane potential through the activation of caspases 3 and 7 [54,55].

Regarding the biological pathways modulated by miR-130a and miR-9 found increased in EVs from the seminal plasma of LF ejaculates, the most negatively modulated pathway was Fatty Acid Biosynthesis ($p < 1.7E-20$). Interestingly, some of the predicted targets are key genes such as ACACA and FASN. It is not new that fatty acids are involved in several metabolic and biological processes, such as cell membrane scaffolding and energy source [56]. Boar seminal plasma is a heterogeneous mixture containing several organic and inorganic components as proteins and lipids [29,57–59]. The plasma membrane of boar sperm cells consists mainly of lipids and proteins, being the lipids divided in approximately 70% phospholipids, 25% neutral lipids, and 5% glycolipids, and its composition is directly related to cryotolerance [58,60]. Furthermore, these important molecules are responsible for generating energy via glycolysis and oxidative phosphorylation, sustaining motility and mainly maintaining the plasma membrane's stability and functionality [61]. Therefore, it is possible to suggest that fatty acid dysfunction can decrease sperm motility and plasma membrane integrity, resulting in lower spermatozoa viability, and raw boar's sperm cells with low viability are more suggest a cryodamage and death cell [1,62,63]. Another biological pathway affected for miR-130a and miR-9 was Lysine Degradation ($p < 0.0006$), which are directly related to Fatty Acid Biosynthesis in several species, but in pigs, it is the first limiting amino acid and play a crucial role in energy production through L-carnitine synthesis [64]. This essential molecule plays action in long-chain fatty acids transport to inside the mitochondria, thus allowing the cells to break triacylglycerol molecules in ATP through the β -oxidation system and get energy from the stored fat acids reserves throughout L-carnitine, helping to reduce the oxidative stress [65]. Disorders of fatty acid oxidation and metabolism usually are related to L-carnitine deficiency, and these defects lead to increase lipolysis, lipid peroxidation, and altered plasma membrane permeability since these factors are affected during freeze-thawing of boars ejaculates [1,66]. Therefore, sperm cells with these disorders can still be more susceptible to cold-shock during sperm cryopreservation.

In this way, this is the first description that miR-503 found in greater abundance of sperm cells from LF boar ejaculates, suggesting a significant role of this miRNA to early spermatozoa development since it could negatively modulate critical pathways in male primordial germ cells, resulting in problematic sperm cells. Similarly, the miR-130a and miR-

9 were directly related to energy production, which is essential to maintain spermatozoa's plasma membrane integrity and motility. However, miRNA through different via can affect the biological process directly associated with boar spermatozoa's structure and functionally. Furthermore, considering the biological material used for miRNA purification, miR-503 in sperm cells, and miR-130a and miR-9 in EVs from seminal plasma, we can affirm the relation of sperm miR-503 with spermatogenesis and miR-130a and miR-9 related with spermatid maturation process, demonstrating the consistency of our results. Thus, we can consider miRNAs from boar spermatozoa and EVs from seminal plasma in ejaculates are biomarkers of spermatid cryotolerance in boars, and this is an important step to can be used the miRNA as a tool in the swine industry. However, it is reasonable to consider that more work in this area is needed.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

This research was funded by São Paulo Research Foundation (FAPESP), grants number 2014/22887-0 (JCS), 2015/21829-9 (JCS), 2018/12500-1 (AFCA), and 2016/24690-4 (AFCA). National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), grants number 420152/2018-0 (JCS), and 308989/2020-1 (AFCA). Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel—Brazil (CAPES—Finance code 001).

Author contribution statement

ACP conceived the study, performed experiments, analyzed the data, and wrote the paper. MAT performed experiments and critically read the article. DVA provided the material (animals) for the study. JEPP performed experiments. SMMKM analyzed the data and critically read the article. JCS conceived the study, provided the material and critically read the article. AFCA conceived the study, provided the material, critically read the article, provided the funding and coordinated the project.

Acknowledgements

The authors thank Flavia Vieira de Freitas for her help with project design.

References

- [1] Yeste M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology* 2016;85:47–64. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.047>.
- [2] Torres MA, Díaz R, Bogue R, Martins SMMK, Ravagnani GM, Leal DF, et al. 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* 2016;11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160988>.
- [3] Waberski D, Riesenbeck A, Schulze M, Weitze KF, Johnson L. Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present and future challenges. *Theriogenology* 2019;137:2–7. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.030>.
- [4] Saravia F, Wallgren M, Nagy S, Johannisson A, Rodríguez-Martínez H. Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: Effects on sperm viability. *Theriogenology* 2005;63:1320–33. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.06.012>.
- [5] Knox R V. The fertility of frozen boar sperm when used for artificial insemination. *Reprod Domest Anim* 2015;50:90–7. <https://doi.org/10.1111/rda.12552>.
- [6] Peña FJ, Saravia F, Núñez-Martínez I, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez Martinez H. Do different portions of the boar ejaculate vary in their ability to sustain cryopreservation? *Anim Reprod Sci* 2006;93:101–13.
- [7] Techakumphu M, Buranaamnuay K, Tantasuparuk W, Am-I N. Improvement of Semen Quality by Feed Supplement and Semen Cryopreservation in Swine. *Success Artif. Insemin. - Qual. Semen Diagnostics Employ.*, 2013, p. 17–37. <https://doi.org/10.5772/51737>.
- [8] Valencia J, Yeste M, Quintero-Moreno A, Niño-Cardenas C del P, Henao FJ. Relative content of Niemann-Pick C2 protein (NPC2) in seminal plasma, but not that of spermadhesin AQN-1, is related to boar sperm cryotolerance. *Theriogenology* 2020;145:181–9. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.10.023>.

- [9] Roca J, Hernández M, Carvajal G, Vázquez JM, Martínez EA. Factors influencing boar sperm cryosurvival. *J Anim Sci* 2006;84:2692–9. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-094>.
- [10] Fraser L, Brym P, Pareek CS, Mogielnicka-Brzozowska M, Paukzto, Jastrzębski JP, et al. Transcriptome analysis of boar spermatozoa with different freezability using RNA-Seq. *Theriogenology* 2020;142:400–13. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.11.001>.
- [11] Marin S, Chiang K, Bassilian S, Lee WNP, Boros LG, Fernández-Novell JM, et al. Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. *FEBS Lett* 2003;554:342–6. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01185-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01185-2).
- [12] Parrilla I, Perez-Patiño C, Li J, Barranco I, Padilla L, Rodriguez-Martinez H, et al. Boar semen proteomics and sperm preservation. *Theriogenology* 2019;137:23–9. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.033>.
- [13] Höfner L, Luther AM, Palladini A, Fröhlich T, Waberski D. Tolerance of stored boar spermatozoa to autologous seminal plasma: A proteomic and lipidomic approach. *Int J Mol Sci* 2020;21:1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms21186474>.
- [14] Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell* 2018;173:20–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>.
- [15] Ha M, Kim VN. Regulation of 654 microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:509–24. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>.
- [16] Urabe F, Kosaka N, Yoshioka Y, Egawa S, Ochiya T. The small vesicular culprits: the investigation of extracellular vesicles as new targets for cancer treatment. *Clin Transl Med* 2017;6. <https://doi.org/10.1186/s40169-017-0176-z>.
- [17] da Silveira JC, Andrade GM, Collado M del, Sampaio R V., Sangalli JR, Silva LA, et al. Supplementation with small-extracellular vesicles from ovarian follicular fluid during in vitro production modulates bovine embryo development. *PLoS One* 2017;12:1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179451>.

- [18] Procópio MS, de Avelar GF, Costa GMJ, Lacerda SMSN, Resende RR, de França LR. MicroRNAs in Sertoli cells: implications for spermatogenesis and fertility. *Cell Tissue Res* 2017;370:335–46. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2667-z>.
- [19] Gao H, Wen H, Cao C, Dong D, Yang C, Xie S, et al. Overexpression of microRNA-10a in germ cells causes male infertility by targeting rad51 in mouse and human. *Front Physiol* 2019;10:1–12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00765>.
- [20] Luo Z, Liu Y, Chen L, Ellis M, Li M, Wang J, et al. microRNA profiling in three main stages during porcine spermatogenesis. *J Assist Reprod Genet* 2015;32:451–60. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0406-x>.
- [21] Zhang Y, Dai D, Chang Y, Li Y, Zhang M, Zhou G, et al. Cryopreservation of boar sperm induces differential microRNAs expression. *Cryobiology* 2017;76:24–33. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.04.013>.
- [22] Alves MBR, de Arruda RP, De Bem THC, Florez-Rodriguez SA, Sá Filho MF de, Belleannée C, et al. Sperm-borne miR-216b modulates cell proliferation during early embryo development via K-RAS. *Sci Rep* 2019;9:1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46775-8>.
- [23] Ran MX, Zhou YM, Liang K, Wang WC, Zhang Y, Zhang M, et al. Comparative analysis of microRNA and mRNA profiles of sperm with different freeze tolerance capacities in boar (*Sus scrofa*) and giant panda (*ailuropoda melanoleuca*). *Biomolecules* 2019;9:1–18. <https://doi.org/10.3390/biom9090432>.
- [24] Torres MA, Ravagnani GM, Leal DF, Martins SMMK, Muro BBD, Meirelles FV., et al. Seminal plasma arising from the whole boar sperm-rich fraction increases the stability of sperm membrane after thawing^{1,2}. *J Anim Sci* 2016;94:1906–12. <https://doi.org/10.2527/jas.2016-0293>.
- [25] Barth AD, Oko RJ. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. 1989.

- [26] Torres MA, Monteiro MS, Passarelli MS, Papa FO, Dell'Aqua JA, Alvarenga MA, et al. The ideal holding time for boar semen is 24 h at 17 °C prior to short- cryopreservation protocols. *Cryobiology* 2019;86:58–64. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.12.004>.
- [27] Alves MBR, Arruda RP de, Batissaco L, Garcia-Oliveros LN, Gonzaga VH, Nogueira VJM, et al. Changes in miRNA levels of sperm and small extracellular vesicles of seminal plasma are associated with transient scrotal heat stress in bulls. *Theriogenology* 2021;161:26–40. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.11.015>.
- [28] Baishya SK, Biswas RK, Kadirvel G, Deka BC, Kumar S, Sinha S, et al. Effect of conventional and controlled freezing method on the post thaw characteristics of boar spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2014;149:231–7. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.06.020>.
- [29] Pavaneli APP, Passarelli MDS, de Freitas FV, Ravagnani GM, Torres MA, Martins SMMK, et al. Removal of seminal plasma prior to liquid storage of boar spermatozoa: A practice that can improve their fertilizing ability. *Theriogenology* 2019;125. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.10.020>.
- [30] Passarelli M da S, Pinoti Pavaneli AP, Mouro Ravagnani G, Pasini Martins M, Pedrosa AC, Maria Massami Kitamura Martins S, et al. Effects of different equilibration times at 5 °C on boar sperm cryotolerance. *Anim Reprod Sci* 2020;219. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106547>.
- [31] Kenigsberg S, Wyse BA, Librach, Clifford L, Da Silveira JC. Chapter 26. Spine Imaging 2017;1660:321–41. <https://doi.org/10.1093/med/9780199393947.003.0026>.
- [32] De Ávila ACFM, Bridi A, Andrade GM, Del Collado M, Sangalli JR, Nociti RP, et al. Estrous cycle impacts microRNA content in extracellular vesicles that modulate bovine cumulus cell transcripts during in vitro maturation. *Biol Reprod* 2020;102:362–75. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz177>.

- [33] Da Silveira J, Andrade GM, Perecin F, Meireles FV, Winger QA, Bouma GJ. Isolation and analysis of exosomal MicroRNAs from ovarian follicular fluid. *Methods Mol. Biol.*, vol. 1733, 2018, p. 53–63. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7601-0_4.
- [34] Ying SY. *MicroRNA Protocols*. vol. 1733. 2018. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7601-0_23.
- [35] Benjamini Y, Hochberg Y. <Benjamini&Hochberg1995_FDR.pdf>. *J R Stat Soc* 1995;57:289–300. <https://doi.org/10.2307/2346101>.
- [36] Baroni S, Romero-Cordoba S, Plantamura I, Dugo M, D'Ippolito E, Cataldo A, et al. Exosome-mediated delivery of miR-9 induces cancer-Associated fibroblast-like properties in human breast fibroblasts. *Cell Death Dis* 2016;7:1–9. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.224>.
- [37] Lu J, Liu QH, Wang F, Tan JJ, Deng YQ, Peng XH, et al. Exosomal miR-9 inhibits angiogenesis by targeting MDK and regulating PDK/AKT pathway in nasopharyngeal carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2018;37:1–12. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0814-3>.
- [38] Wu J, Dong T, Chen T, Sun J, Luo J, He J, et al. Hepatic exosome-derived miR-130a-3p attenuates glucose intolerance via suppressing PHLPP2 gene in adipocyte. *Metabolism* 2020;103:154006. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2019.154006>.
- [39] Gao Y, Jia D, Hu Q, Li D. Foxl3, a target of MIR-9, stimulates spermatogenesis in spermatogonia during natural sex change in *monopterus albus*. *Endocrinology* 2016;157:4388–99. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1256>.
- [40] Luo H, Chen B, Weng 741 B, Tang X, Chen Y, Yang A, et al. miR-130a promotes immature porcine Sertoli cell growth by activating SMAD5 through the TGF- β - PI3K/AKT signaling pathway. *FASEB J* 2020;34:15164–79. <https://doi.org/10.1096/fj.202001384R>.

- [41] Li W, Li J, Mu H, Guo M, Deng H. MiR-503 suppresses cell proliferation and invasion of gastric cancer by targeting HMGA2 and inactivating WNT signaling pathway. *Cancer Cell Int* 2019;19:1–12. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0875-1>.
- [42] Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003;113:685–700. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00432-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00432-X).
- [43] Loveland KL, Hime G. TGF β superfamily members in spermatogenesis: Setting the stage for fertility in mouse and *Drosophila*. *Cell Tissue Res* 2005;322:141–6. <https://doi.org/10.1007/s00441-005-0008-0>.
- [44] Spiller C, Burnet G, Bowles J. Regulation of fetal male germ cell development by members of the TGF β superfamily. *Stem Cell Res* 2017;24:174–80. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.07.016>.
- [45] Ni F Da, Hao SL, Yang WX. Multiple signaling pathways in Sertoli cells: recent findings in spermatogenesis. *Cell Death Dis* 2019;10. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1782-z>.
- [46] Iwanaga A, Wang G, Gantulga D, Sato T, Baljinnyam T, Shimizu K, et al. Ablation of the scaffold protein JLP causes reduced fertility in male mice. *Transgenic Res* 2008;17:1045–58. <https://doi.org/10.1007/s11248-008-9191-6>.
- [47] Almog T, Naor Z. The role of Mitogen activated protein kinase (MAPK) in sperm functions. *Mol Cell Endocrinol* 2010;314:239–43. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.05.009>.
- [48] Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 2000;60–61:481–92. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00099-3).
- [49] Kumaresan 770 A, Siqueira AP, Hossain MS, Johannisson A, Eriksson I, Wallgren M, et al. Quantification of kinetic changes in protein tyrosine phosphorylation and cytosolic Ca²⁺ concentration in boar spermatozoa during cryopreservation. *Reprod Fertil Dev* 2012;24:531–42. <https://doi.org/10.1071/RD11074>.

- [50] Jaldety Y, Breitbart H. ERK1/2 mediates sperm acrosome reaction through elevation of intracellular calcium concentration. *Zygote* 2015;23:652–61.
<https://doi.org/10.1017/S096719941400029X>.
- [51] Saucedo L, Buffa GN, Rosso M, Guillardoy T, Góngora A, Munuce MJ, et al. Fibroblast growth factor receptors (FGFRs) in human sperm: Expression, functionality and involvement in motility regulation. *PLoS One* 2015;10:1–17.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127297>.
- [52] Danciu TE, Adam RM, Naruse K, Freeman MR, Hauschka P V. Calcium regulates the PI3K-Akt pathway in stretched osteoblasts. *FEBS Lett* 2003;536:193–7.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00055-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00055-3).
- [53] Aparicio IM, Bragado MJ, Gil MC, Garcia-Herreros M, Gonzalez-Fernandez L, Tapia JA, et al. Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway Regulates Sperm Viability But Not Capacitation on Boar Spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 2007;74:1035–42.
<https://doi.org/10.1002/mrd.20663>.
- [54] Aitken RJ, Findlay JK, Hutt KJ, Kerr JB. Apoptosis in the germ line. *Reproduction* 2011;141:139–50. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0232>.
- [55] Gallardo Bolaños JM, Balao Da Silva CM, Martín Muñoz P, Morillo Rodríguez A, Plaza Dávila M, Rodríguez-Martínez H, et al. Phosphorylated AKT preserves stallion sperm viability and motility by inhibiting caspases 3 and 7. *Reproduction* 2014;148:221–35.
<https://doi.org/10.1530/REP-13-0191>.
- [56] Beld J, Lee DJ, Burkart MD. Fatty acid biosynthesis revisited: Structure elucidation and metabolic engineering. *Mol Biosyst* 2015;11:38–59.
<https://doi.org/10.1039/c4mb00443d>.
- [57] Lavon U, Bournsnel JC. The split ejaculate of the boar: contributions of the epididymides and seminal vesicles. *J Reprod Fertil* 1975;42:541–52.
<https://doi.org/10.1530/jrf.0.0420541>.

- [58] Nikolopoulou M, Soucek DA, Vary JC. Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation. *Biochim Biophys Acta* 1985;815:486–98.
- [59] Pavaneli APP, Recuero S, Chaves BR, Garcia-Bonavila E, Llavanera M, Pinart E, et al. The presence of seminal plasma during liquid storage of pig spermatozoa at 17°C modulates their ability to elicit in vitro capacitation and trigger acrosomal exocytosis. *Int J Mol Sci* 2020;21. <https://doi.org/10.3390/ijms21124520>.
- [60] Yeste M, Rodríguez-Gil JE, Bonet S. Artificial insemination with frozen-thawed boar sperm. *Mol Reprod Dev* 2017;84:802–13. <https://doi.org/10.1002/mrd.22840>.
- [61] Hossain MDS, Tareq KMA, Hammano KI, Tsujii H. Effect of fatty acids on boar sperm motility, viability and acrosome reaction. *Reprod Med Biol* 2007;6:235–9. <https://doi.org/10.1111/j.1447-0578.2007.00191.x>.
- [62] Collodel G, Castellini C, Lee JCY, Signorini C. Relevance of Fatty Acids to Sperm Maturation and Quality. *Oxid Med Cell Longev* 2020;2020. <https://doi.org/10.1155/2020/7038124>.
- [63] Yeste M. Recent advances in boar sperm cryopreservation: State of the art and current perspectives. *Reprod Domest Anim* 2015;50:71–9. <https://doi.org/10.1111/rda.12569>.
- [64] Regmi N, Wang T, Crenshaw MA, Rude BJ, Liao SF. Effects of dietary lysine levels on the concentrations of selected nutrient metabolites in blood plasma of late-stage finishing pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2018;102:403–9. <https://doi.org/10.1111/jpn.12714>.
- [65] Pekala J, Patkowska-Sokola B, Bodkowski R, Jamroz D, Nowakowski P, Lochynski S, et al. L-Carnitine - Metabolic Functions and Meaning in Humans Life. *Curr Drug Metab* 2011;12:667–78. <https://doi.org/10.2174/138920011796504536>.
- [66] Hoppel C. The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism. *Am J Kidney Dis* 2003;41:4–12. [https://doi.org/10.1016/S0272-6386\(03\)00112-4](https://doi.org/10.1016/S0272-6386(03)00112-4).

Supplementary data

Table 1. Characteristics of raw and post-holding time boar sperm (before the cryopreservation process) for high (HF) and low freezability (LF) ejaculates.

Boar sperm assessment	Freezability		P-value
	High	Low	
Raw semen			
Total motility (%)	88.1 ± 2.0	85.7 ± 2.5	0.132
Progressive motility (%)	87.3 ± 1.2	85 ± 3.5	0.186
Vigor (1-5)	4.5 ± 0.2	4.7 ± 0.2	0.537
Intact plasma membrane (%)	92.5 ± 1.7	95.3 ± 1.5	0.267
Intact acrosome (%)	96.1 ± 1.8	97.8 ± 0.7	0.425
Post-holding time semen			
Total motility (%)	88.1 ± 3.0	88.2 ± 4.2	0.993
Progressive motility (%)	87.3 ± 3.4	87.6 ± 4.4	0.959
Intact plasma membrane (%)	95.0 ± 1.3	91.3 ± 2.6	0.261
Intact acrosome (%)	98.3 ± 0.3	98.6 ± 0.3	0.654

Table 2. Characteristics boar sperm kinematics at post-thaw in high and low freezability.

Item	Freezability		P-value
	High	Low	
Total motility (TM, %)	35.53 ± 2.72 ^a	14.58 ± 1.22 ^b	0.004
Progressive motility (PM, %)	21.68 ± 2.55 ^a	5.93 ± 0.70 ^b	0.001
Curvilinear velocity (VCL; µm/s)	60.10 ± 4.24 ^a	44.6 ± 3.71 ^b	0.033
Straight-line velocity (VSL; µm/s)	26.85 ± 2.32 ^a	19.02 ± 1.52 ^b	0.030
Average path velocity (VAP; µm/s)	35.75 ± 3.45	26.05 ± 2.47	0.062
Linearity (LIN; %)	44.59 ± 1.92	42.70 ± 1.49	0.467
Straightness (STR; %)	75.32 ± 1.90	73.33 ± 1.40	0.431
Wobble (WOB; %)	59.18 ± 1.87	58.25 ± 1.72	0.727
Amplitude of lateral head displacement (ALH; µm)	3.58 ± 0.05	3.53 ± 0.15	0.780
Beat cross-frequency (BCF; Hz)	5.79 ± 0.23	5.93 ± 0.43	0.792

^{ab}Means without a common superscript letter differ (P < 0.05).

Table 3. Post-thaw boars' sperm membranes high and low freezability.

Item ¹	Freezability		P-value
	High	Low	
IP (%)	42.19 ± 3.07 ^a	27.67 ± 4.53 ^b	0.038
IA (%)	49.30 ± 4.96	49.73 ± 12.65	0.975
IPIA (%)	41.71 ± 3.74 ^a	19.22 ± 2.25 ^b	0.002
MF (a.u.)	6483.50 ± 1394.99	9624.00 ± 1575.08	0.186
MP (%)	37.15 ± 1.16 ^a	15.78 ± 2.97 ^b	0.005
LP (a.u.)	809.00 ± 66.52	923.25 ± 43.20	0.199
OS (a.u.)	667.75 ± 37.98	740.75 ± 73.83	0.413

^{ab}Means without a common superscript letter differ (P < 0.05).

¹Abbreviations: IP, Intact plasma membrane; IA, Intact acrosome membrane; IPIA, Intact of plasma and acrosome membranes; MF, Sperm membrane fluidity; MP, Mitochondrial membrane potential; LP, Lipid peroxidation; OS, Oxidative stress.

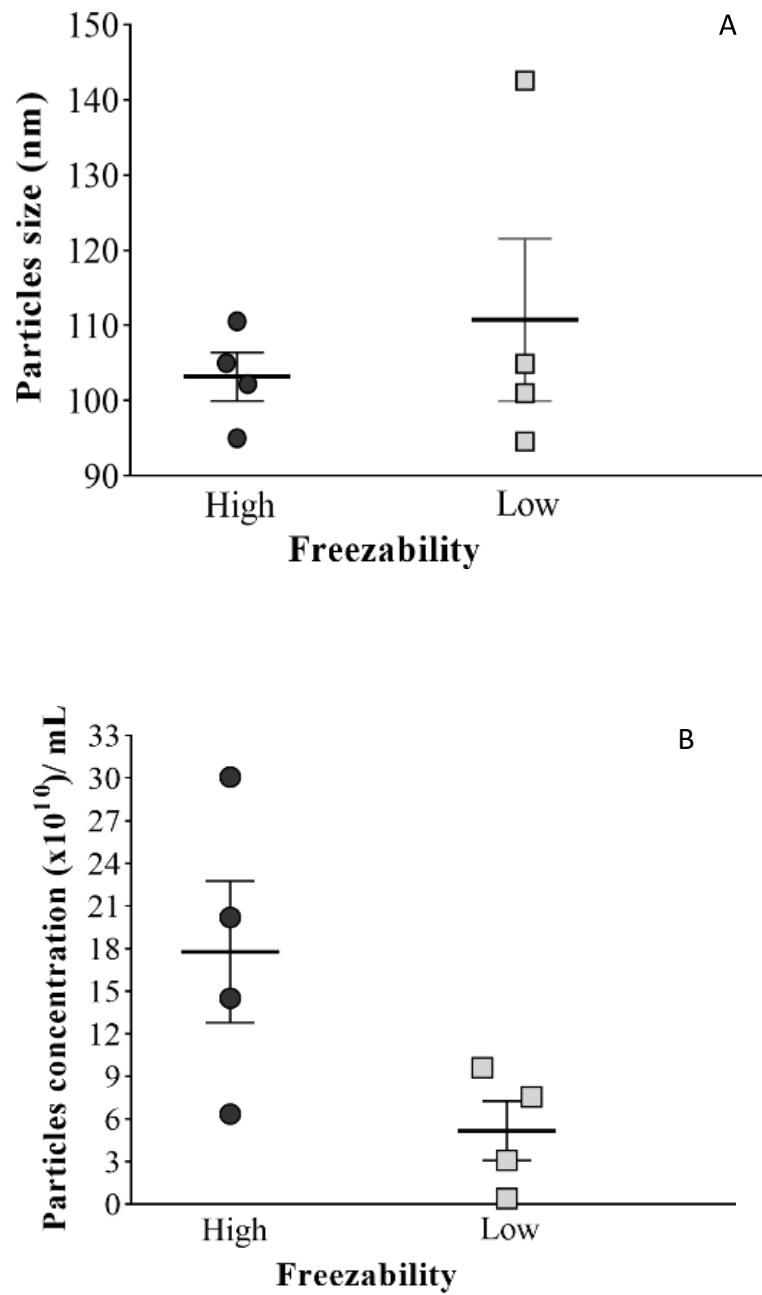


Figure 1. Particles size (A) and concentration (B) of EVs from seminal plasma of boar ejaculate with high and low freezability.

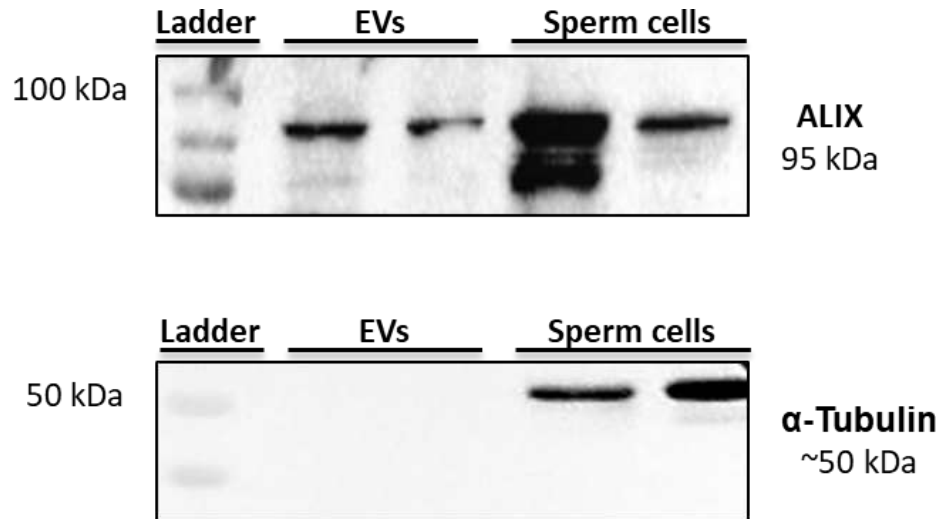


Figure 2. Western blotting analysis using ALIX and α -tubulin proteins to validate EVs presence and absence of sperm cell contamination.

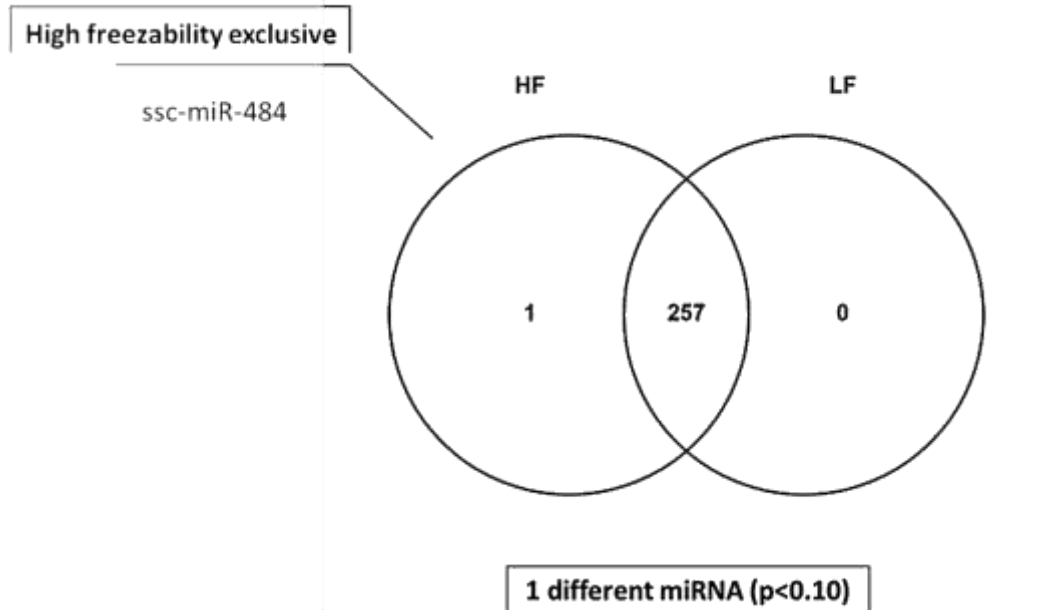


Figure 3. Venn diagram of 258 detected miRNAs in sperm cells from HF (HighFreezability) or LF (Low Freezability) ejaculates from a profile of 383 miRNAs.

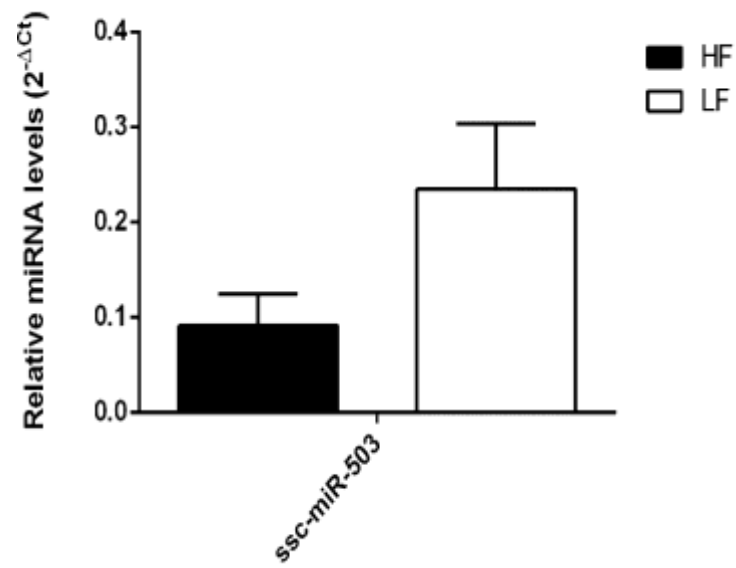


Figure 4. Relative levels of ssc-miR-503, which was differently increased ($P < 0.10$) in sperm cells of LF (Low Freezability) compared to HF (High Freezability) ejaculates.

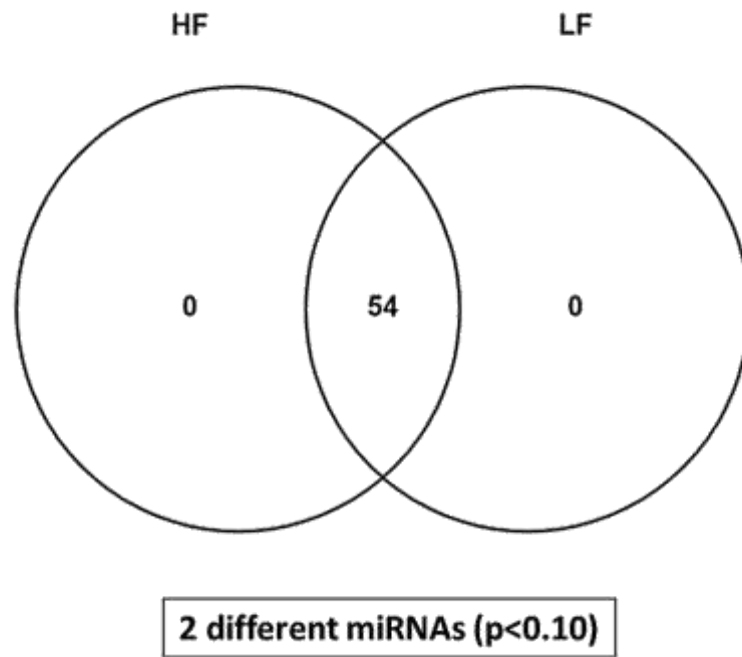


Figure 5. Venn diagram of 54 detected miRNAs in extracellular vesicles of seminal plasma from HF (High Freezability) or LF (Low Freezability) ejaculates from a profile of 383 miRNAs.

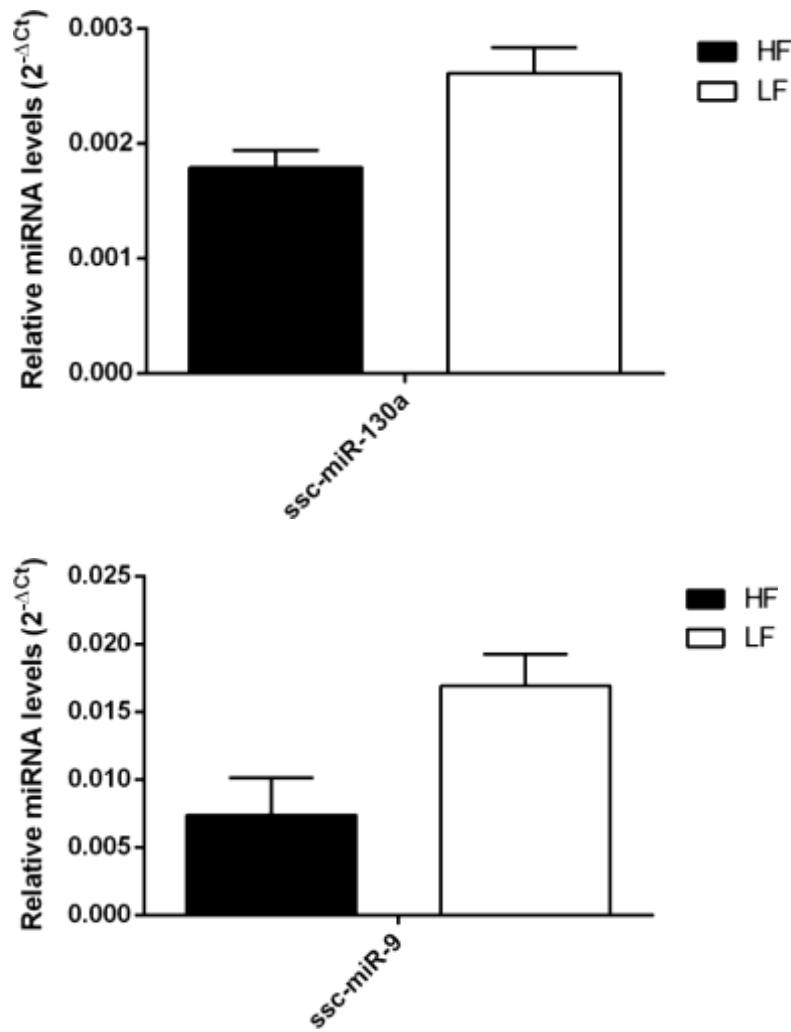


Figure 6. Relative levels of miRNAs differently altered ($P < 0.10$) in EVs from seminal plasma of LF (Low Freezability) ejaculates (A) ssc-miR-130a; (B) ssc-miR-9.

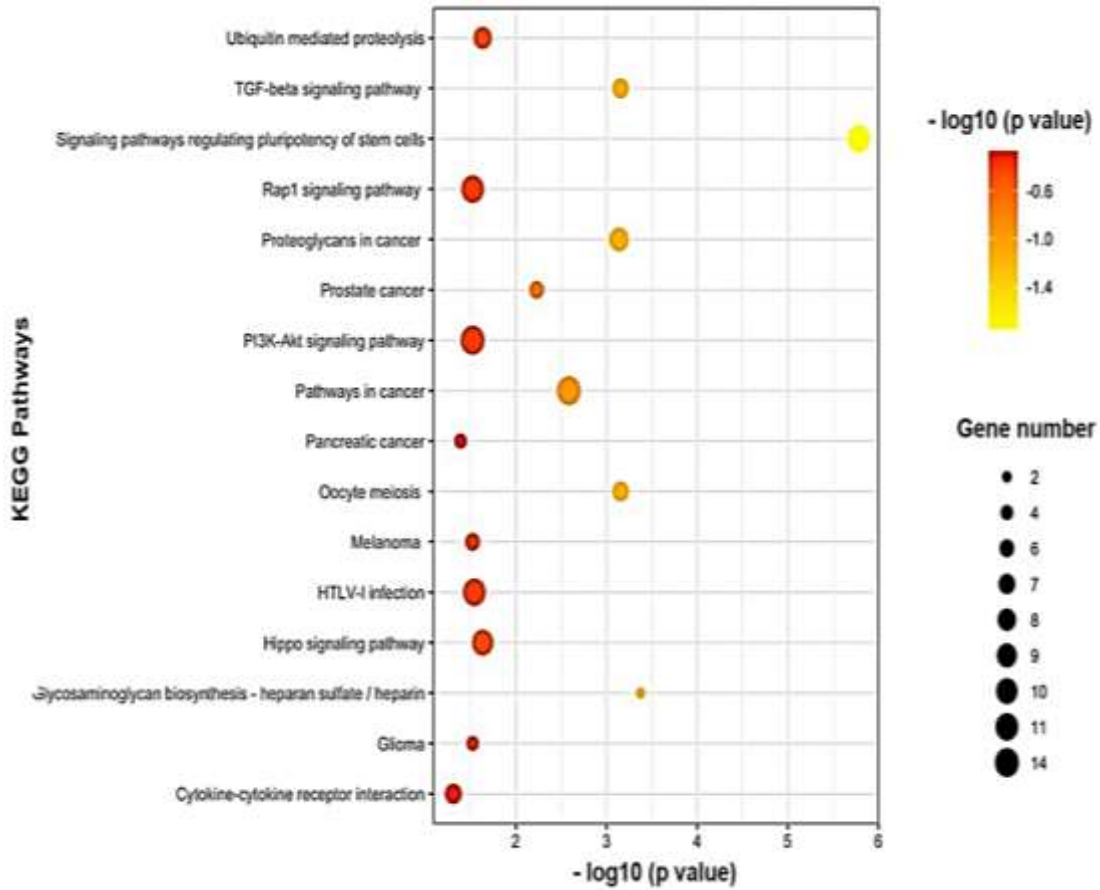


Figure 7. Overrepresented biological pathways modulated by miR-503-5p found in sperm cells of ejaculates with low freezability according to the adjusted *p*-value. The adjusted *p* values were normalized using $-\log_{10}$.

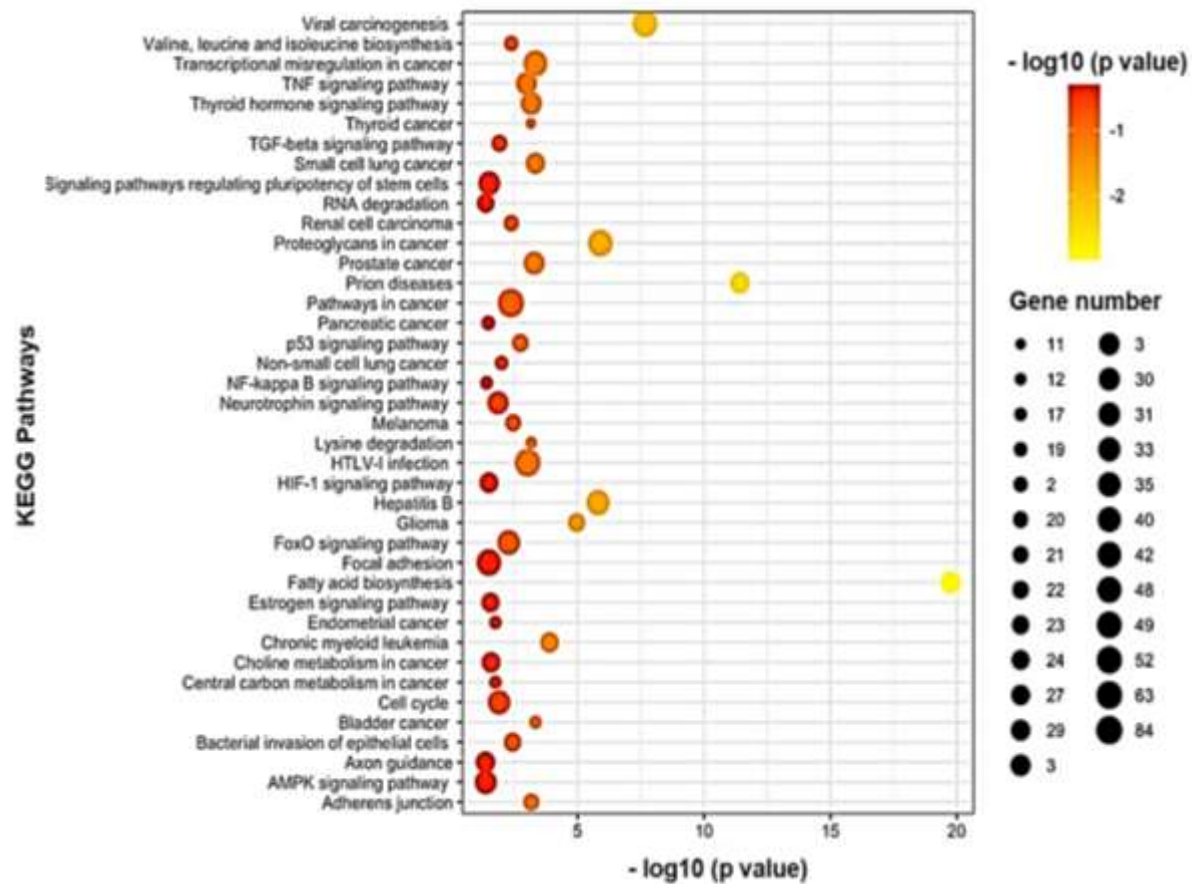


Figure 8. Overrepresented biological pathways modulated by miRNAs found in EVs from seminal plasma of ejaculates with low freezability according to the adjusted p -value. The adjusted p values were normalized using $-\log_{10}$.

6 CONCLUSÕES

Através deste estudo, descobrimos que o miR-503 está em maior abundância nas células espermáticas provenientes de ejaculados BC e, de acordo com a análise de enriquecimento, este possui um papel-chave no desenvolvimento inicial dos espermatozoides, haja vista que, pode impactar negativamente vias biológicas relacionadas diretamente com as células germinativas primordiais de machos, resultando em espermatozoides defeituosos. Além disso, concluímos que o miR-130a e miR-9, encontrados em maior abundância nas VEs do plasma seminal de ejaculados BC, estavam diretamente relacionados a produção de energia, que é imprescindível para que a célula espermática consiga manter a sua motilidade e integridade de sua membrana plasmática. Deste modo, conseguimos elucidar um importante mecanismo de ação dos miRNAs na andrologia suína e o seu impacto tanto na síntese quanto na maturação espermática. Com estes importantes resultados, podemos afirmar que os miRNAs, acima citados, são biomarcadores de criotolerância espermática em suínos, sendo este um passo importante para que o miRNA possa ser utilizado como ferramenta na indústria suína.

REFERÊNCIAS

- ABELS, E. R.; BREAKFIELD, X. O. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 36, n. 3, p. 301–312, 2016.
- ALVES, M. B. R.; CELEGHINI, E. C. C.; BELLEANNÉE, C. From Sperm Motility to Sperm-Borne microRNA Signatures: New Approaches to Predict Male Fertility Potential. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, n. August, p. 1–16, 2020.
- ANDERSON, P.; KEDERSHA, N. RNA granules: Post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 6, p. 430–436, 2009.
- ANDRADE, A. F. C. et al. Post-thaw addition of seminal plasma reduces tyrosine phosphorylation on the surface of cryopreserved equine sperm, but does not reduce lipid peroxidation. **Theriogenology**, v. 77, n. 9, p. 1866- 1872.e3, 2012.
- ANDRADE, A. F. C. et al. Protocolos e possibilidades de criopreservação de sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43, n. 2, p. 89–96, 2019.
- BARTEL, D. P. Review MicroRNAs : Target Recognition and Regulatory Functions. **Cell**, p. 215–233, 2009.
- BRITO, M. M. et al. Comparison of Cryopreservation Protocols (Single and Two-steps) and Thawing (Fast and Slow) for Canine Sperm. **ANQ - Quarterly Journal of Short Articles Notes and Reviews**, v. 30, n. 1, p. 67–73, 2017.
- CASAS, I. et al. 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, n. 1, p. 69–75, 2013.
- CELEGHINI, E. C. C. et al. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v. 104, n. 2–4, p. 119–131, 2008.
- CHAMPROUX, A. et al. Mammalian sperm nuclear organization: Resiliencies and vulnerabilities. **Basic and Clinical Andrology**, v. 26, n. 1, p. 1–22, 2016.
- CHANDRA, S. et al. Role of miRNAs in development and disease: Lessons learnt from small organisms. **Life Sciences**, v. 185, n. 5, p. 8–14, 2017.
- CHEN, X. et al. Profiling of miRNAs in porcine germ cells during spermatogenesis. **Reproduction**, v. 154, n. 6, p. 789–798, 2017.
- CHEVILLET, J. R. et al. Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 41, p. 14888–14893, 2014.

COUMANS, F. A. W. et al. Methodological guidelines to study extracellular vesicles. **Circulation Research**, v. 120, n. 10, p. 1632–1648, 2017.

CRICK, F. Central Dogma of Molecular Biology. **Nature**, v. 227, p. 309–309, 1970.

CURRY, E.; SAFRANSKI, T. J.; PRATT, S. L. Differential expression of porcine sperm microRNAs and their association with sperm morphology and motility. **Theriogenology**, v. 76, n. 8, p. 1532–1539, 2011.

DAI, D. H. et al. Exploration of miRNA and mRNA profiles in fresh and frozen-thawed boar sperm by transcriptome and small RNA sequencing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4, p. 1–19, 2019.

DAS, P. J. et al. Stallion Sperm Transcriptome Comprises Functionally Coherent Coding and Regulatory RNAs as Revealed by Microarray Analysis and RNA-seq. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 2013.

DIAS, C. P. et al. Contaminação bacteriana no ejaculado de suínos submetidos a dois métodos de higienização e coleta. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 28, n. 1, 2000.

DU, J. et al. Boar seminal plasma exosomes maintain sperm function by infiltrating into the sperm membrane. **Oncotarget**, v. 7, n. 37, p. 58832–58847, 2016.

FRASER, L. et al. Transcriptome analysis of boar spermatozoa with different freezability using RNA-Seq. **Theriogenology**, v. 142, p. 400–413, 2020.

GIBB, Z.; AITKEN, R. J. The Impact of Sperm Metabolism during in Vitro Storage: The Stallion as a Model. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

GROOT, M.; LEE, H. Sorting Mechanisms for MicroRNAs into Extracellular Vesicles and Their Associated Diseases. **Cells**, v. 9, n. 4, p. 1–16, 2020.

GRÖTTER, L. G. et al. Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 4, p. 655–665, 2019.

GYGI, S. P. et al. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. **Nature Biotechnology**, v. 17, p. 994–999, 1999.

HOLT, W. V. et al. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: Insights from the cryomicroscope. **Theriogenology**, v. 63, n. 2 SPEC. ISS., p. 370–382, 2005.

JOVIČIĆ, M.; CHMELÍKOVÁ, E.; SEDMÍKOVÁ, M. Cryopreservation of boar semen. **Czech Journal of Animal Science**, v. 65, n. 4, p. 115–123, 2020.

KNOX, R. V. et al. The effect of extender, method of thawing, and duration of storage on in vitro fertility measures of frozen-thawed boar sperm. **Theriogenology**, v. 84, n. 3, p. 407–412, 2015.

- KORHONEN, H. M. et al. DICER regulates the formation and maintenance of cell-Cell junctions in the mouse seminiferous epithelium. **Biology of Reproduction**, v. 93, n. 6, p. 1–13, 2015.
- KOTAJA, N. MicroRNAs and spermatogenesis. **Fertility and Sterility**, v. 101, n. 6, p. 1552–1562, 2014.
- LUO, Z. et al. microRNA profiling in three main stages during porcine spermatogenesis. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 32, n. 3, p. 451–460, 2015.
- MEDRANO, A.; HOLT, W. V.; WATSON, P. F. Controlled freezing studies on boar sperm cryopreservation. **Andrologia**, v. 41, n. 4, p. 246–250, 2009.
- MONTEIRO, M. S. et al. **Is it feasible to cryopreserve boar semen in one-step method?** Anais do III Simpósio Internacional de Sanidade e Produção de Suínos SIMPORK. **Anais.2019**
- MORI, M. A. et al. Extracellular miRNAs: From Biomarkers to Mediators of Physiology and Disease. **Cell Metabolism**, v. 30, n. 4, p. 656–673, 2019.
- MORRELL, J. M. et al. Removal of bacteria from boar semen using a low-density colloid. **Theriogenology**, v. 126, p. 272–278, 2019.
- MOUSTACAS, V. S.; HENRY, M.; ECHEVERRI, A. M. L. Criopreservação espermática. In: HENRY, M.; ECHEVERRI, A. M. L. (org). **Andrologia Veterinária Básica: Curso de Andrologia Veterinária Básica**. Belo Horizonte: CAED-UFMG, 2013. p. 194.
- MURDICA, V. et al. Seminal plasma of men with severe asthenozoospermia contain exosomes that affect spermatozoa motility and capacitation. **Fertility and Sterility**, v. 111, n. 5, p. 897- 908.e2, 2019.
- NASCIMENTO, J. et al. Effects of Sperm Concentration and Straw Volume on Motion Characteristics and Plasma, Acrosomal, and Mitochondrial Membranes of Equine Cryopreserved Spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, n. 6, p. 351–358, 2008.
- PASSARELLI, M. DA S. et al. Effects of different equilibration times at 5 °C on boar sperm cryotolerance. **Animal Reproduction Science**, v. 219, n. July, p. 106547, 2020.
- PEDROSA, A. C. et al. Are miRNAs related to sperm cryotolerance in boars. **Animal Reproduction**, v. 17, n. 3, 2020.
- PEÑA, F. J. et al. Detection of early changes in sperm membrane integrity pre-freezing can estimate post-thaw quality of boar spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 97, n. 1–2, p. 74–83, 2007.
- PEZO, F. et al. Preservation of boar semen: An update. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 3, p. 423–434, 2019.

- PROFET, M. Menstruation as a defense against pathogens transported by sperm. **The Quartely Review of Biology**, v. 75, n. 4, p. 385–407, 2015.
- RAPOSO, G.; STAHL, P. D. Extracellular vesicles: a new communication paradigm? **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 9, p. 509–510, 2019.
- RAUBER, L. P. RNA espermático, uma visão holística. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 4, p. 309–317, 2015.
- RAVAGNANI, G. M. et al. Cryopreservation of boar semen in 0.5mL straws at low spermatozoa concentration is better than high concentration to maintain sperm viability. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 9, p. 1726–1730, 2018.
- RO, S. et al. Cloning and expression profiling of small RNAs expressed in the mouse ovary. **Rna**, v. 13, n. 12, p. 2366–2380, 2007.
- ROCA, J. et al. Factors influencing boar sperm cryosurvival. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 10, p. 2692–2699, 2006.
- SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Freezing of boar semen can be simplified by handling a specific portion of the ejaculate with a shorter procedure and MiniFlatPack packaging. **Animal Reproduction Science**, v. 117, n. 3–4, p. 279–287, 2010.
- TECHAKUMPHU M, BURANAAMNUAY K, TANTASUPARUK W, AM-IN, N. **Improvement of semen quality by feed supplement and semen cryopreservation in swine.** [s.l: s.n.]. v. 32
- THURSTON, L. M. et al. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 3, p. 545–554, 2002.
- TORRES, M. A. et al. Seminal plasma arising from the whole boar sperm-rich fraction increases the stability of sperm membrane after thawing. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. 5, p. 1906–1912, 2016.
- TORRES, M. A. et al. Cryobiology The ideal holding time for boar semen is 24 h at 17 ° C prior to short- cryopreservation protocols. **Cryobiology**, v. 86, n. August 2018, p. 58–64, 2019.
- VICENTE-CARRILLO, A. **Sperm membrane channels , receptors and kinematics . Using boar spermatozoa for drug toxicity screening.** [s.l: s.n.].
- VOJTECH, L. et al. Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 11, p. 7290–7304, 2014.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 481–492, 2000.
- YADAV, R. P.; KOTAJA, N. Small RNAs in spermatogenesis. **Molecular and Cellular**

Endocrinology, v. 382, n. 1, p. 498–508, 2014.

YESTE, M. et al. 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. Recent advances in boar sperm cryopreservation: State of the art and current perspectives. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, 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.

YESTE, M.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; BONET, S. Artificial insemination with frozen-thawed boar sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v. 84, n. 9, p. 802–813, 2017.

ZABOROWSKI, M. P. et al. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. **BioScience**, v. 65, n. 8, p. 783–797, 2015.

ZHANG, Y. et al. Selection of endogenous reference microRNA genes for quantitative reverse transcription polymerase chain reaction studies of boar spermatozoa cryopreservation. **Theriogenology**, v. 83, n. 4, p. 634–641, 2015.

ZHANG, Y. et al. Cryopreservation of boar sperm induces differential microRNAs expression. **Cryobiology**, v. 76, p. 24–33, 2017.

APÊNDICE

Theriogenology

Spermatozoa and seminal plasma small extracellular vesicles miRNAs as biomarkers of boar semen cryotolerance --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Original Research Article
Keywords:	Cryopreservation; spermatogenesis; spermatozoa; boar; swine
Corresponding Author:	Andre Furugen Cesar de Andrade, DVM, Ph.D. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo São Paulo, São Paulo BRAZIL
First Author:	Ana Carolina Pedrosa, Msc, DVM
Order of Authors:	Ana Carolina Pedrosa, Msc, DVM Mariana A. Torres, DVM, MSc, PhD Diego Vilela Alkmin, DVM, Msc, PhD Jorge E. P. Pinzon, Msc, DVM Simone Maria M. K. Martins, DVM, Msc, PhD Juliano C. da Silveira, Msc, PhD Andre Furugen Cesar de Andrade, DVM, Ph.D.
Abstract:	Freeze boar semen is still the biggest challenge for the swine industry due to the high cold shock sensitivity of boar sperm cells and the variance of post-thaw results among individuals and ejaculates from the same boar. To solve this problem, we investigate if miRNAs present in sperm cells and small extracellular vesicles (EVs) from seminal plasma of raw boar ejaculates can predict high-quality ejaculates after underwent the freeze-thaw process. For this, we obtained miRNAs samples of sperm cells and EVs from raw seminal plasma from 27 ejaculates before the cryopreservation process. Two groups with different freezability considering the analysis post-thaw of structure and sperm functionality were formed: High freezability (HF; n=04) and low freezability (LF; n=04). That done, we investigated the miRNAs profile of sperm cells and EVs from seminal plasma in both groups. Three miRNAs were differently abundant in LF ejaculates, being the ssc-miR-503 found in higher levels in sperm cells. The ssc-miR-130a and ssc-miR-9 most abundant in EVs from seminal plasma (P <0.10). Through enrichment analysis, it was possible to verify that these miRNAs could be performing modifications in the development of male germ cells and in the production of energy to spermatozoa to maintain their viability and functionality. Therefore, we can demonstrate that ssc-miR-503, ssc-miR-130a, and ssc-miR-9 are related to low sperm cryotolerance in boars semen. So those miRNAs can be used as a biomarker to predict their low ability to tolerate the cryopreservation process.