

GABRIELA BERTAIOLLI ZOCA

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

Pirassununga

2019

GABRIELA BERTAIOLLI ZOCA

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

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

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda

De acordo: _____

Orientador

Pirassununga
2019

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

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3865
FMVZ

Zoca, Gabriela Bertaiolli

Efeitos da presença do plasma seminal sobre a integridade de membranas, cromatina e citoesqueleto de espermatozoides de touros / Gabriela Bertaiolli Zoca. – 2019.
66 f. : il.

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

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda.

1. Espermatozoide. 2. Congelação. 3. Refrigeração. 4. Período de equilíbrio. 5. Touros.
I. Título.



São Paulo, 19 de junho de 2019
CEUA N 2161020817

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Rubens Paes De Arruda
Área: Reprodução Animal

Título da proposta: "Efeitos da presença do plasma seminal sobre a integridade de membranas, cromatina e citoesqueleto de espermatozoides de touros".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ (ID 004869)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 04/junho/2019) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Estamos solicitando a mudança do Título da Dissertação de Mestrado da orientada Gabriela Bertaiolli Zoca de "Efeitos do supercooling sobre características espermáticas de touros" para "Efeitos da presença do plasma seminal sobre a integridade de membranas, cromatina e citoesqueleto de espermatozoides de touros". O motivo da nossa solicitação foi que, ao término do experimento, concluímos que este outro título seria mais adequado. Gostaríamos de informar que a metodologia inicial proposta não sofreu nenhuma mudança. Ou seja, estamos solicitando apenas a mudança do título da Dissertação. Atenciosamente, "

Comentário da CEUA: "Solicita-se apenas a mudança de título para a versão final da dissertação."

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ZOCA, Gabriela Bertaiolli. Efeitos da presença do plasma seminal sobre a integridade de membranas, cromatina e citoesqueleto de espermatozoides de touros.

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Em memória de meu pai, meu maior incentivador, minha estrela guia.
À ti, todo meu amor, reconhecimento e gratidão.
É por você e para você.*

“For the rest of my life I will search for moments full of you.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais (**Messias e Ana Cristina**) e minha irmã (**Julia** – amor da minha vida) por sempre terem acreditado nos meus sonhos, investido tanto dinheiro, tempo e dedicação para que se tornassem realidade. Por terem abdicado de vários momentos em família, aberto mãos de finais de semana, aniversários, feriados e férias por entenderem meus sonhos. Por sempre me incentivarem e me amarem. Principalmente à minha mãe, que se desdobrou no último ano e meio, em meio a tanta dor, tirou forças para sempre me incentivar a continuar, a sorrir e me dizer palavras de encorajamento e conforto. Eu não teria insistido e persistido tanto se não tivesse o apoio de vocês o tempo todo me dizendo que sou capaz. **AMO VOCÊS PARA SEMPRE.**

Agradeço ao meu namorado (**Gabriel**) que não só viveu comigo, mas também me deu suporte em toda essa jornada cheia de altos e baixos me apoiando, ensinando, me amando e não me permitindo desistir no momento mais difícil da minha vida. Por ser um modelo de determinação, persistência, coragem e humildade. Obrigada!

Agradeço imensamente ao **Professor Rubens** por ter mudado minha vida e percepção da nossa profissão. Por ter me mostrado o tão vasto e mágico mundo da ciência, ter passado tanto tempo se dedicando a me ensinar, me moldando e fazendo com que me apaixonasse ainda mais pela ciência, conhecimento e descoberta. Obrigada por ter acreditado em mim, no meu potencial. Obrigada também por ter se tornado tão grande amigo, que levo com tanto carinho dentro do peito. Obrigada por ter me acolhido, quase como filha, no momento mais difícil da minha vida, por ter me entendido e me respeitado. Cada conversa, sobre ciência ou sobre a vida, está guardada em um lugar muito especial. Não me cabe em palavras expressar o quanto o senhor é querido e importante na minha vida.

As minhas tão queridas colegas de laboratório **Renata e Patrícia**, por sempre terem sido prontas a me ensinar, a trabalharmos tão bem em grupo e ao respeito. **Renata**, obrigada pelo treinamento e estar sempre por perto para apoiar o grupo. **Patrícia**, minha querida amiga, como a vida foi boa em ter te colocado no meu caminho, obrigada por cada conversa, cada momento de silêncio (que foram ainda mais importantes), cada janta e filme (não assistido). Por ter dividido comigo todas as alegrias e dores que passamos nesses quase 4 anos juntas. Crescemos muito juntas!! Obrigada por tudo!

Agradeço ao **Professor Guilherme Pugliesi** pela grande ajuda com as análises estatísticas deste trabalho, à **Professora Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção** e ao pós doutorando **Adriano Siqueira** pela contribuição neste trabalho com as análises de cromatina. Agradeço ao trabalho em equipe, à disposição em nos auxiliar e aos esforços não medidos para que esse trabalho fosse bem feito.

Meu muito obrigada à querida **Professora Carla**, por sempre estar presente e pronta para nos socorrer quando o Professor Rubens não estava, por me permitir participar das aulas e me aprimorar. Pelos momentos de mãe que me proporcionou quando eu não podia estar perto da minha, por ter feito bolos de cenoura e pudins de tapioca, por ter sorrido comigo e me confortado. Por ser tão carinhosa num mundo onde as pessoas são tão duras. A senhora tocou meu coração. Obrigada.

Aos colaboradores do CBRA: **Clayton** por sempre ter me ajudado com toda a burocracia e pelos momentos de descontração na copa. **Seu João, Márcio e Zé Maria**, muitíssimo obrigada por todo o apoio ao longo desses anos, tanto nas estações de monta equina com as éguas, os ganhões e os animais machucados, quanto com toda a ajuda impecável que me ofereceram neste trabalho, todos os dias trazendo os touros e

auxiliando para nossa segurança nas colheitas de sêmen. Além de todos os bons momentos de descontração, piadas e muitas risadas, não posso agradecer-los o bastante.

*Aos meus grandes amigos **Nataly** e **Leonardo**, por terem feito a vida tão leve nesses anos com todas as risadas que arrancaram de mim. Obrigada por sempre terem estado ao meu lado nos bons e maus momentos. Por sempre ouvirem minhas lamentações, meus dramas e todas as besteiras com o melhor dos humores. Penso em vocês e imediatamente sorrio, obrigada, meus amigos, por serem tão especiais e por serem aqueles para quem eu sempre corria quando precisava me desligar do mundo e só ser feliz por um instante.*

Aos demais professores e colegas do VRA, obrigada a todos por terem me auxiliado com qualquer que fosse meu problema ou dúvida, pelas conversas e risadas, pela descontração e conhecimentos compartilhados, pela união e sensação de família, por sempre fazerem com que eu me sentisse parte de um todo.

Agradeço o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

MUITO OBRIGADA.

RESUMO

ZOCA, G. B. **Efeitos da presença do plasma seminal sobre a integridade de membranas, cromatina e citoesqueleto de espermatozoides de touros.** 2019. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Muitos dos protocolos de congelação utilizados ainda hoje são empíricos com cerca de 40 a 50% de espermatozoides não sobreviventes ao processo e aqueles que sobrevivem são afetados estrutural ou funcionalmente após a descongelação. Ademais, existem controversas quanto aos efeitos do plasma seminal no processo de congelação, podendo ser benéfico quanto a capacitação ou deletério quanto ao armazenamento e criopreservação espermática. Definir o efeito da retirada do plasma seminal em cada etapa do processo de congelação, assim como o momento mais crítico e prejudicial aos espermatozoides seria importante para o avanço da criopreservação do sêmen bovino. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da remoção do plasma seminal e do processo de congelação sobre a integridade de membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, remodelação dos filamentos de actina do citoesqueleto e fragmentação de cromatina espermática durante a refrigeração, período de equilíbrio e congelação/dcongelação. Para isso, cada ejaculado foi dividido em duas alíquotas (com plasma seminal= PS e sem plasma seminal= SPS) com concentração final de 50×10^6 esptz/palheta, envasadas em palhetas de 0.5mL e acondicionadas em uma máquina de congelação automática com porta-palhetas vertical. Foram realizadas 41 colheitas de 7 touros da raça Nelore. Os dados obtidos dos procedimentos experimentais foram analisados com auxílio do software *Statistical Analysis for Windows SAS*[®], versão 9.3 (SAS 2005). Houve efeito das etapas do processo de congelação para todas as características estudadas exceto fragmentação de cromatina. A presença plasma seminal preservou melhor a integridade acrossomal e também proporcionou menor remodelação dos filamentos de actina do citoesqueleto (75.2% e 71.7%; 29.9% e 32.4%, respectivamente) que a sua ausência no processo de congelação. A refrigeração induziu maior remodelação de F-actina que as etapas de período de equilíbrio e congelação/dcongelação (56.3%, 32.2% e 23.9%, respectivamente). A congelação/dcongelação é a etapa em que há mais danos no processo de congelação para as características avaliadas pois, há o acúmulo das injúrias causadas pelas etapas anteriores ao longo do processo ($P < 0.05$). Concluímos que a presença do plasma seminal preserva melhor a integridade acrossomal e proporciona menor remodelação dos

filamentos de actina do citoesqueleto espermático que a ausência do plasma seminal, entretanto, a presença ou ausência do plasma seminal tem pouca influência sobre a membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial e nenhum impacto sobre a cromatina espermática.

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

ABSTRACT

ZOCA, G. B. **Effects of the presence of seminal plasma on the integrity of membranes, chromatin and cytoskeleton of bull spermatozoa.** 2019. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019

Many of the freezing protocols used today are empirical with about 40 to 50% non-surviving spermatozoa and those that survive are structurally or functionally affected after thawing. Moreover, there are controversies regarding the effects of seminal plasma on the freezing process, which may be beneficial for capacitation or deleterious for sperm storage and cryopreservation. Defining the effect of seminal plasma withdrawal at each stage of the freezing process, as well as the most critical and damaging moment for spermatozoa would be important for the advancement of bovine semen cryopreservation. The aim of this study was to evaluate the effect of seminal plasma removal and freezing process on plasma and acrosomal membrane integrity, mitochondrial membrane potential, remodeling of cytoskeleton actin filament and sperm chromatin fragmentation during cooling, equilibration period and freezing/thawing. For this, each ejaculate was divided into two aliquots (with seminal plasma = PS and without seminal plasma = SPS) with a final concentration of 50×10^6 spz/straw, packed in 0.5mL straws and put in an automatic freezer machine with vertical straw holder. Forty-one ejaculates were collected out from 7 Nelore bulls. Data obtained from the experimental procedures were analyzed with the aid of *Statistical Analysis for Windows SAS®* software, version 9.3 (SAS 2005). The presence or absence of seminal plasma did not differ significantly in any of the characteristics studied. The presence of seminal plasma better preserved acrosomal integrity and also provided less remodeling of cytoskeleton actin filaments (75.2% and 71.7%; 29.9% and 32.4%, respectively) than its absence in the freezing process. Refrigeration induced greater F-actin remodeling than the equilibrium period and freezing/thawing steps (56.3%, 32.2% and 23.9%, respectively). Freezing/thawing is the stage where there is more damage to the freezing process for the evaluated characteristics, since there is accumulation of injuries caused by the previous steps throughout the process ($P < 0.05$). In conclusion, the presence of seminal plasma better preserves acrosomal integrity and provides less remodeling of spermatocytoskeleton actin filaments than the absence of seminal plasma; however, the presence or absence of

seminal plasma has little influence on plasma membrane, membrane potential. mitochondrial and no impact on sperm chromatin.

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Tabela 1 - Médias (\pm erros padrão) das porcentagens de espermatozoides com integridade de membrana plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial, remodelação dos filamentos de actina (F-actina) do citoesqueleto e fragmentação de cromatina dos tratamentos com e sem plasma seminal (PS e SPS) em momentos do processo de congelação do sêmen bovino.....**62**
- Figura 1 - Esquematisação das etapas avaliadas e curvas utilizadas (refrigeração, período de equilíbrio e congelação) durante o processo de congelação do sêmen bovino.....**63**
- Figura 2 - Médias (\pm erros padrão) das porcentagens de espermatozoides com integridade de membrana plasmática (MPI), acrossomo íntegro (AI) e alto potencial mitocondrial (AMP) e integridade de membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial (PIAIA) em momentos do processo de congelação do sêmen bovino.....**63**
- Figura 3 - Médias (\pm erros padrão) das porcentagens de espermatozoides com integridade de acrossomo (AI%) dos tratamentos com e sem plasma seminal (PS e SPS) em sêmen bovino congelado.....**64**
- Figura 4 - Médias (\pm erros padrão) da redução das porcentagens de espermatozoides com integridade de membranas plasmática (MPI), acrossomal (AI), potencial mitocondrial (APM) e integridade de membrana plasmática, acrossomal e alto potencial mitocondrial (PIAIA) em momentos do processo de congelação do sêmen bovino.....**64**
- Figura 5 - Médias (\pm erros padrão) das porcentagens de espermatozoides com remodelação dos filamentos de actina (F-actina) do citoesqueleto em momentos do processo de congelação de sêmen bovino.....**65**
- Figura 6 - Médias (\pm erros padrão) da redução das porcentagens de espermatozoides com remodelação dos filamentos de actina (F-actina) do citoesqueleto em momentos do processo de congelação do sêmen bovino.....**65**
- Figura 7 - Médias (\pm erros padrão) das porcentagens de espermatozoides com remodelação dos filamentos de actina (F-actina) do citoesqueleto dos tratamentos com e sem plasma seminal (PS e SPS) no sêmen bovino congelado.....**66**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
SCSA	Sperm Chromatin Structure Assay
vs.	<i>Versus</i>
h	Hora
min.	Minuto
PMAI	Integridade de membrana plasmática e acrossomal
BSP	Proteínas ligadoras de fosfolipídios
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
F-actina	Filamentos de actina
ROS	Espécies reativas de oxigênio
PS	Plasma seminal
SPS	Sem plasma seminal
PIAIA	Integridade de membrana plasmática, acrossomal e alto potencial mitocondrial
MPI	Integridade de membrana plasmática
AI	Integridade acrossomal
APM	Alto potencial mitocondrial
$C_6H_8O_7$	Ácido cítrico
Na_2HPO_4	Fosfato dissódico
NaCl	Cloreto de sódio
HCl	Ácido clorídrico

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
±	Mais ou menos
≥	Maior ou igual
≤	Menor ou igual
>	Maior
<	Menor
~	Aproximadamente
=	Igual
-	Negativo
x	Vezes
®	Registrado
:	Para (diluição)
mL	Mililitro
L	Litro
mg	Miligrama
μL	Microlitro
μg	Micrograma
mM	Milimolar
μM	Micromolar
kDa	Quilo-Dalton
R ²	Coefficiente de determinação
P	Nível de significância
Sptz	Espermatozoides

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	17
2.	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1.	CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA	19
2.1.1	Etapa de refrigeração	20
2.1.2	Período de equilíbrio	22
2.1.3	Etapa de congelação	24
2.1.4	Etapa de descongelação	27
2.2.	PLASMA SEMINAL	28
2.3.	OBJETIVOS	30
	REFERÊNCIAS	30
3.	EFEITO DA PRESENÇA E AUSÊNCIA DO PLASMA SEMINAL NAS DIFERENTES ETAPAS DO PROCESSO DE CONGELAÇÃO DO SÊMEN BOVINO	38
3.1.	INTRODUÇÃO	38
3.2.	MATERIAL E MÉTODOS	41
3.2.1	Animais e colheita do sêmen	41
3.2.2	Avaliação e centrifugação do sêmen	42
3.2.3	Criopreservação do sêmen	42
3.2.4	Análises funcionais do sêmen com e sem plasma seminal	43
3.2.4.1	Avaliação da integridade das membranas plasmática, acrossomal e função mitocondrial espermáticas	43
3.2.4.2	Avaliação da remodelação dos filamentos de actina do citoesqueleto espermático	43
3.2.4.3	Avaliação da fragmentação da cromatina espermática	44
3.2.5	Análise estatística	45
3.3	RESULTADOS	46
3.3.1	Avaliação da integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial espermático nas etapas do processo de congelação	47
3.3.2	Avaliação da remodelação dos filamentos de actina do citoesqueleto espermático nas etapas do processo de congelação	47

3.3.3	Avaliação da fragmentação da cromatina espermática nas etapas do processo de congelamento	48
3.4.	DISCUSSÃO	48
	REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO GERAL

Segundo Royere e colaboradores (1996) e Grötter et al. (2019), a primeira tentativa de preservação de espermatozoides data de mais de 200 anos quando Lazaro Spallanzani, em 1776 tentou congelar espermatozoides humanos na neve. A partir daí o progresso científico se deu com a descoberta das propriedades crioprotetoras do glicerol (POLGE et al., 1949) e, desde então, as técnicas para criopreservação espermática progrediram lentamente nos últimos anos e o atual desempenho, mensurado como a sobrevivência espermática pós descongelação, não é muito diferente comparado às décadas passadas (GRÖTTER et al., 2019). Apesar da criopreservação ser empregada como técnica de rotina no processamento de sêmen bovino, cerca de 40 a 50% dos espermatozoides não sobrevivem aos processos de congelação e descongelação (HOLT, 2000; WATSON, 2000).

Vários estudos sobre criobiologia encontraram fatores físicos e biológicos que afetam a sobrevivência espermática em baixas temperaturas durante o processo de criopreservação, geralmente envolvendo a integridade das membranas espermáticas (GRÖTTER et al., 2019), como a membrana plasmática (JOHANNISSON et al., 2018), acrossomal (GRÖTTER et al., 2019), e função mitocondrial (KHALIL et al., 2018), assim como, os filamentos de actina do citoesqueleto (PEÑA et al., 2011) e a estrutura da cromatina (PERIS et al., 2004). Também, notou-se que danos celulares de diferentes graus de severidade são induzidos por mecanismos distintos em cada fase da criopreservação e o estado funcional das células congeladas-descongeladas é o resultado do acúmulo de injúrias ao longo do processo de congelação (MEDEIROS et al., 2002).

Considera-se que o processo de criopreservação seja resultado de várias etapas, tais quais, a diluição do sêmen à temperatura ambiente, refrigeração até 5°C seguido por um período variável de equilíbrio à 5°C, a congelação incluindo o *supercooling* e por fim a descongelação.

Durante a refrigeração, as mudanças de temperatura produzem alterações físicas na membrana, que passa do estado líquido ao de líquido-cristalino, no qual os fosfolípidios não podem se mover de modo aleatório, devido ao deslocamento lateral induzido pela refrigeração, resultando na formação de domínios cristalinos, apenas pequenas regiões de lípidios líquidos permanecem e as proteínas integrais são agrupadas nesses domínios de lípidios líquidos restantes, tornando estas áreas frágeis e susceptíveis a rupturas, fusões e permeáveis a íons (AMANN; PICKETT, 1987; HAMMERSTEDT

et al., 1990; WATSON, 1995; HOLT, 2000).

Ao atingir entre 6 e 4°C, os espermatozoides são mantidos nesta temperatura por tempo determinado, que é denominado período de equilíbrio ou tempo de estabilização. Acredita-se que este período é importante para a adaptação das membranas espermáticas a baixas temperaturas (MUIÑO et al., 2007; LEITE et al., 2010) e possibilita a translocação da água, diminuindo lesões que possam ser causadas pela nucleação do gelo durante a congelação e descongelação (VISHWANATH; SHANNON, 2000).

Após o término do período de equilíbrio, inicia-se a fase de congelação, onde ao atingir a temperatura de 0°C, a água entra em fusão e começa a congelar formando cristais de gelo extracelulares. Entretanto, o soluto tem o ponto de fusão abaixo do da água e antes que haja a formação de cristais de gelo ocorre o *supercooling*, provocando o aumento da temperatura pela liberação de calor latente, que é necessário para a cristalização (OZKAVUKCU & ERDEMLI, 2002; MEDEIROS et al., 2002). Como resultado da criopreservação podem ocorrer dentre tantas, alterações drásticas na organização lipídica da membrana, podendo haver perda de proteínas, da motilidade espermática, funcionalidade do acrossomo que causa redução da qualidade do espermatozoide e capacidade de fertilização (WATSON, 1995; NARESH, 2016).

E por fim, após a congelação dos espermatozoides, esses agora passam pelo processo de descongelação, no qual são expostos a um ambiente hipotônico, resultando em aumento de volume celular devido ao influxo de água no citoplasma, que continua até que as concentrações de soluto intra e extracelular estejam equilibradas (PEÑA et al., 2011).

O dano celular ocorre potencialmente devido a esse estresse osmótico duplo: o estresse hiperosmótico durante a congelação, na qual os espermatozoides perdem água para o meio e encolhem até que as concentrações de soluto intracelular e extracelular estejam equilibradas (MAZUR, 1984), seguido pelo insulto hiposmótico na descongelação. Como resultado, a lesão mais óbvia é o dano à membrana plasmática devido ao encolhimento e edema das células (PEÑA et al., 2011).

Além das lesões que o processo de criopreservação causa aos espermatozoides, há também os efeitos do plasma seminal. Existem controvérsias quanto a esses efeitos, podendo ser benéficos por “proteger” os espermatozoides dentro do sistema reprodutivo feminino e auxiliar na capacitação espermática (MANJUNATH; THÉRIEN, 2002; MAXWELL et al., 2007) ou deletérios quando relacionados aos processos de preservação (WAY et al., 2000; MANJUNATH; THÉRIEN, 2002).

Mesmo com avanços neste campo, ainda não estão bem definidos os efeitos da presença ou da ausência do plasma seminal em cada etapa do processo de congelação e, tampouco, estão bem definidos os efeitos deletérios que os espermatozoides sofrem em cada etapa do processo de criopreservação (refrigeração, equilíbrio, congelação/descongelação) uma vez que, na quase totalidade das publicações científicas, estes danos são observados apenas antes e no final do processo de congelação (descongelação). Buscar o entendimento por qual (ais) etapa (s) deste processo ocorre mais danos aos espermatozoides e se a presença e/ou ausência causa lesões ou melhora alguma (s) característica (s) espermática (s) em alguma etapa ou no processo como um todo, com certeza, deverá contribuir para o aprimoramento da técnica. Com isso, propor novas pesquisas a fim de melhorar os resultados de congelação e fertilidade do sêmen bovino.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA

O sucesso da criopreservação do sêmen depende da manutenção do potencial de fertilidade dos espermatozoides que precisam apresentar integridade e funcionalidade das diferentes estruturas celulares, tais quais, a integridade do flagelo, as mitocôndrias garantindo a produção de ATP e logo a motilidade, a integridade do núcleo para manter estável o armazenamento de DNA e do acrossomo para que ocorra a fecundação e ligação ao oócito (AMANN & PICKETT, 1987; HAMMERSTEDT et al., 1990).

Para entender a importância das crioinjúrias é necessário conhecer a estrutura espermática. O espermatozoide é dividido em cabeça, peça intermediária, peça principal e peça final; é constituído de um núcleo altamente condensado e estruturas membranosas, microtubulares e fibrosas. Apesar das estruturas microtubulares e fibrosas serem importantes para a motilidade espermática, porque constituem parte do axonema, fibras densas e bainha fibrosa das peças intermediária e principal, as estruturas membranosas são importantes da perspectiva do choque frio, sendo elas a membrana plasmática, membrana acrossomal interna e externa, membrana nuclear e membrana interna mitocondrial. O núcleo altamente condensado provavelmente contém pouca água, assim, a maior parte da água de dentro do espermatozoide está localizada nos espaços

intermembranosos ou no interior das estruturas, como acrossomo e mitocôndrias (AMANN & PICKETT, 1987).

Apesar de diversas publicações a respeito da criopreservação de sêmen, pouco se mudou ao longo das décadas. Foram estudadas diferentes concentrações de espermatozoides na palheta, volumes, composição e concentração de diluidores e crioprotetores e, apesar de tudo, ainda se tem cerca de 40 a 50% de perdas, indicando que novas pesquisas são necessárias. No entanto, de forma quase unânime, os trabalhos avaliam os efeitos da criopreservação somente nos momentos da diluição, envase e descongelação, mesmo sabendo que o processo de criopreservação é dividido nas etapas de refrigeração, período de equilíbrio, congelação incluindo o *supercooling* e a descongelação. Isso indica que para que ocorra evolução no processo de criopreservação, estudos investigando essas etapas são necessários para elucidar em quais momentos deste processo estão ocorrendo mais ou menos lesões nos espermatozoides.

2.1.1 Etapa de refrigeração

Na refrigeração, o metabolismo espermático é reduzido com a atenuação da temperatura, sendo diminuído pela metade a cada queda de 10°C. Logo, quando os espermatozoides são refrigerados da temperatura corporal até 5°C, seu metabolismo é reduzido para cerca de 10% do original; diminuindo também o crescimento microbiano e consequentemente mantendo a viabilidade do sêmen por um período maior de tempo (SQUIRES et al, 1999). Existe, porém, uma faixa crítica de temperatura no processo de refrigeração em que os espermatozoides podem ser severamente danificados. Em bovinos, essa faixa compreende dos 15 aos 5°C (DROBNIS et al., 1993; WATSON, 2000).

A membrana plasmática consiste em uma bicamada lipídica com porção hidrofílica de lipídios e proteínas orientados externamente e, cadeias de ácidos graxos hidrofóbicas orientadas ao centro da bicamada (HAMMERSTEDT et al., 1990). Em condições normais, as membranas espermáticas estão em fase fluida e são impermeáveis aos solutos (SIEME et al., 2015). A fluidez das membranas é afetada tanto pela concentração de fosfolipídios e colesterol quanto pela temperatura da membrana. Quando as membranas são refrigeradas, os lipídios estão sujeitos à transição do estado fluido natural para o estado líquido-cristalino, no qual as cadeias de ácidos graxos se tornam desordenadas (LEMMA, 2011). A refrigeração causa mudanças na distribuição

de fosfolipídios pela bicamada da membrana, resultando em alterações de função (DE LEEUW et al., 1990). Além dessas alterações, modificações em canais de proteínas específicas e regulação de cálcio podem levar à um aumento da permeabilidade da membrana plasmática. A absorção e elevação de concentração de cálcio intracelular durante o processo de refrigeração contribui para o início da capacitação, modificações na hiperativação e desenvolvimento de eventos de fusão entre a membrana plasmática e a membrana acrossomal externa, tendo como consequência, redução na capacidade de fertilização do espermatozoide (BAILEY et al., 2000; WATSON, 2000).

Muitos fatores podem alterar a fluidez da membrana plasmática, sendo a temperatura no processo de refrigeração um fator importante, porém não o único, pois este altera a estrutura ou conformação das biomoléculas como lipídios, proteínas, ácidos nucleicos, podendo ser irreversíveis e prejudicar suas funções (AMANN & PICKET, 1987; SIEME et al., 2015).

O choque frio pode ser causado durante a manipulação do espermatozoide associado a colheita do sêmen ou inseminação artificial, até mesmo quando o sêmen não é intencionalmente refrigerado (HAMMERSTEDT et al., 1990). O choque frio envolve danos às membranas celulares e alteração da função metabólica (MORAN et al., 1992), levando à perda prematura irreversível de movimentos progressivos (GRAHAM, 1996), sendo evidenciado também movimentos circulares e retrógrados (ARRUDA et al, 2009), afetando outras estruturas e funções, como por exemplo, indução de reação acrossomal prematura, alteração da função mitocondrial, falhas na condensação da cromatina que influenciam na viabilidade e fertilidade do espermatozoide (HOLT, 2000; WATSON, 2000). Em adição, elementos do citoesqueleto são termosensíveis, sendo que a refrigeração de outras células resultou em remodelação dos filamentos de actina (HALL et al., 1993).

Segundo Papa e colaboradores (2015) o sêmen refrigerado confere menor taxa de fragmentação de cromatina que o sêmen congelado ($1,2 \pm 0,1$ e $1,6 \pm 0,1$, respectivamente), entretanto não difere do sêmen fresco ($0,9 \pm 0,1$), independentemente da utilização de glicerol ou não no diluidor ($P < 0,05$). Condizendo com esses resultados, o trabalho de Khalil *et al.* (2018) encontrou porcentagem de fragmentação de cromatina nos espermatozoides refrigerados (3.8%) menor que nos espermatozoides congelados e descongelados (8.4%) utilizando a técnica SCSA. Love e colaboradores (2005), avaliaram a relação entre plasma seminal e tipo de diluidor com a motilidade e integridade de DNA espermáticos de equinos. Segundo os autores, após 24 e 48h de

refrigeração, a remoção completa do plasma seminal independentemente do tipo de diluidor utilizado (10.1% e 9.1% após 24 horas e 9.9% e 8.2% após 48 horas) protegeu a integridade do DNA espermático, causando menos lesões à cromatina que quando comparado com a centrifugação e adição de 20% de plasma seminal (15.2% e 16.1% após 24 horas e 17.6% e 15.7% após 48 horas). Em adição, os danos ao DNA ampliaram conforme o nível de plasma seminal aumentou, sugerindo que o plasma seminal contém fatores deletérios ao DNA espermático.

Sabe-se hoje que, a taxa de refrigeração adequada minimiza os danos causados pelo choque frio. Douglas-Hamilton e colegas (1984) obtiveram melhores resultados para motilidade e menor taxa de defeitos morfológicos quando utilizaram curva inicial de refrigeração mais lenta ($<0,33^{\circ}\text{C}/\text{min}$) que curva mais rápida ($>1^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Ademais, ressaltaram que esses efeitos negativos poderiam ser evitados fazendo uso de curva inicial de refrigeração entre $0,2$ e $0,4^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Já, Januskauskas e colaboradores (1999) comparando uma curva de $4,2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e outra de $0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ para refrigerarem espermatozoides bovinos da temperatura ambiente até 4°C não obtiveram diferenças significativas para integridade de membranas plasmática ($49,7 \pm 2,3$ e $48,4 \pm 2,3$, para curva rápida e lenta, respectivamente) e acrossomal ($52,7 \pm 1,5$ e $52,4 \pm 1,5$, para curva rápida e lenta, respectivamente), apesar de terem encontrado diferença significativa quanto a motilidade ($72,5 \pm 1,9$ e $69,0 \pm 1,9$, para curva rápida e lenta, respectivamente).

2.1.2 Período de equilíbrio

Após a refrigeração, os espermatozoides passam por uma etapa chamada de período de equilíbrio ou tempo de estabilização, sobre o qual Watson (1979) sugeriu que antes da congelação, os espermatozoides deveriam permanecer por um certo tempo para que ocorresse a diminuição do metabolismo espermático e iniciassem interações com componentes do meio diluidor, diminuindo dessa forma, os riscos de choque térmico. Acreditava-se que este intervalo era importante para o equilíbrio com o glicerol, especialmente quando utilizados diluidores à base de citrato-gema de ovo, entretanto, já é sabido que o glicerol penetra rapidamente no espermatozoide bovino e pode ser adicionado durante qualquer momento do período de refrigeração (VISHWANATH; SHANNON, 2000; MUIÑO et al., 2007).

Existem controvérsias sobre a necessidade e duração do período de equilíbrio na criopreservação do sêmen, o qual pode variar de 0 minutos até 96 horas antes da

congelamento (DAHMI et al., 1993; MUIÑO et al., 2007; LEITE et al., 2010; FLEISCH et al., 2017; MURPHY et al., 2018) e seus efeitos sobre o espermatozoide (GAO et al., 1997; MUIÑO et al., 2007; LEITE et al., 2010; FLEISCH et al., 2017). Também, existe o desejo de diminuir ou eliminar essa etapa do processo sem comprometer a qualidade dos espermatozoides pós descongelamento. Isto, para se adequar às rotinas de colheita e otimizar a produção e armazenamento de sêmen congelado em centrais (DAHMI et al., 1993; FLEISCH et al., 2017).

Pesquisadores apontam vários benefícios do uso do período de equilíbrio em relação a motilidade, integridade de membranas e função mitocondrial das células espermáticas devido a permissão de translocação da água, diminuindo os danos de formação de gelo durante a congelamento e descongelamento (DAHMI et al., 1993; LEITE et al., 2010; FLEISCH et al., 2017; MURPHY et al., 2018). Experimentos que avaliaram a necessidade do período de equilíbrio, seja este de 2 horas (DAHMI et al., 1993) ou 4 horas (LEITE et al., 2010) demonstraram melhores resultados na criopreservação utilizando o período de equilíbrio que sem o mesmo. Ainda, quando o período de equilíbrio de 3 ou 4 horas foram comparados com um período de 18 ou 24 horas, quanto mais longo o período de equilíbrio, melhor a motilidade pós descongelamento ainda que não tenham obtido diferenças em fertilidade quando comparado períodos de 4 e 24 horas (FOOTE & KAPROTH, 2002). Outros pesquisadores preconizam quatro horas de período de equilíbrio à 5°C para a congelamento do sêmen bovino (BICUDO et al., 1993; THUN et al., 2002; FOOTE & KAPROTH., 2002).

Para Leite e colaboradores (2010) quanto mais longo o período de equilíbrio (4 horas) maior a eficiência na preservação da membrana plasmática, independente do diluidor utilizado. Já a função mitocondrial não seguiu o mesmo padrão, não sendo afetada pelo diluidor utilizado ou pelo período de equilíbrio, sugerindo que este não teve efeito direto sobre a função mitocondrial. Ainda, o período de equilíbrio é benéfico para a integridade das membranas pós descongelamento, bem como sua ausência é prejudicial, pois quando comparados processos de congelamento sem período de equilíbrio ou com período de 2 ou 4 horas, notou-se que quanto maior foi o período utilizado, melhor preservada foi a membrana plasmática das células, independentemente do diluidor utilizado, já que sem o período de equilíbrio foi obtida a menor porcentagem de células com integridade membrana plasmática, acrossomal e alto potencial mitocondrial, bem como a maior porcentagem de membrana plasmática lesada.

Para Fleisch e colaboradores (2017), que estudaram o efeito de diferentes períodos de equilíbrio (4, 24, 48, 72 e 96 horas) e três diferentes diluidores, obtiveram que o período de equilíbrio teve efeito negativo sobre as características de motilidade, integridade de membranas plasmática e acrossomal (PMAI) e fragmentação de DNA avaliadas antes da congelação ($P < 0.01$). Também notaram que aumentar o período de equilíbrio de 4 para 24-72 horas melhora a motilidade, PMAI e potencial mitocondrial do sêmen criopreservado após a descongelação, entretanto, essa melhora depende do diluidor utilizado. Ainda, ao equilíbrio de 96 horas, houve prejuízo na motilidade e PMAI quando comparado com 72 horas (44.0 ± 16.8 e 50.1 ± 14.6 ; 59.5 ± 10.6 e 64.2 ± 10.5 , respectivamente). Ademais, prolongar o período de equilíbrio de 4 para 72 horas não teve efeito sobre a fertilidade a campo.

2.1.3 Etapa de congelação

Quando encerrado o período de equilíbrio, inicia-se o processo de congelação. O desafio das células durante a congelação não é a habilidade de suportar o armazenamento em temperaturas muito baixas e sim, a letalidade de uma zona intermediária de temperatura (~ -15 a -60°C) que as células devem atravessar duas vezes, uma durante a congelação e outra durante a descongelação (MAZUR, 1984), nestes momentos, os espermatozoides estão relativamente inertes (GRAHAM, 1996).

O ponto de solidificação da água é a 0°C , enquanto o de uma solução é determinado pela concentração de solutos (MAZUR, 1984). Quando a temperatura fica abaixo do ponto de congelação da água e antes que haja a formação de cristais de gelo ocorre um fenômeno chamado *supercooling* (MORRIS & ACTON, 2013). *Supercooling* é a habilidade de uma solução aquosa refrigerar além de seu ponto normal de congelação, sem mudar do estado líquido para o sólido. Nessa situação, se a solução aquosa ou a água for tocada por um cristal ou objeto de metal, a cristalização ocorrerá e a temperatura imediatamente retornará ao ponto de congelação. Esse processo é chamado de *seeding* e é utilizado para obter uma congelação controlada manualmente. A cristalização pode ser induzida por partículas no meio, vibrações mecânicas ou superfícies ásperas. Seguida da nucleação de gelo e crescimento inicial dos cristais, a temperatura sobe ao ponto de fusão e permanece relativamente constante nessa temperatura durante a mudança de fase subsequente (platô de calor latente), quando a

temperatura muda mais rapidamente para a temperatura ambiente (OZKAVUKCU; ERDEMLI, 2002).

Na criopreservação de células, existe uma grande propensão do *supercooling* ocorrer. Fatores como temperatura, curva de congelação, volume e pureza das partículas na palheta podem estar relacionados à ocorrência do *supercooling* (OZKAVUKCU; ERDEMLI, 2002).

Até -5°C , as células e o meio circundante permanecem descongelados por causa do *supercooling* e pela redução do ponto de congelação pelos solutos protetores que estão frequentemente presentes. Entre -5 e -15°C , há formação de gelo no meio externo (espontaneamente ou como resultado do *seeding*), mas o conteúdo das células permanece descongelado e super-refrigerado (MAZUR, 1984; GAO; CRITSER, 2000), provavelmente porque a membrana plasmática bloqueia o crescimento de cristais de gelo no citoplasma (MAZUR, 1984). A água super-refrigerada nas células tem, por definição, um potencial químico mais alto que o da água na solução extracelular parcialmente congelada e, em resposta a essa diferença de potencial, a água flui para fora da célula causando desidratação na tentativa de manter o equilíbrio osmótico e congela externamente (MAZUR, 1984; OZKAVUKCU; ERDEMLI, 2002).

As células são expostas a um meio de solução hipertônico gradativamente crescente durante a congelação. Remover uma quantidade específica de água da célula osmoticamente, para evitar a congelação intracelular, antes e, parcialmente, após a nucleação do gelo é essencial. Isso está relacionado à taxa de congelação. Em baixas taxas de congelação, as células tentam permanecer em equilíbrio com a solução externa. A solução externa congela antes do meio intracelular devido aos efeitos protetores das membranas. Assim, o exterior da célula se torna mais hipertônico e ocorre um efluxo de água (exosmose). A remoção de muita água pode levar ao aumento da carga do soluto, o que significa perturbação do equilíbrio. À medida que a taxa de congelação aumenta, há menos tempo para a água sair da célula, que fica cada vez mais super-refrigerada e, eventualmente, ocorre a formação de gelo intracelular que é inevitavelmente letal (OZKAVUKCU; ERDEMLI, 2002).

Assim, os espermatozoides se tornam susceptíveis as altas concentrações de solutos presentes nas pequenas porções de meio extracelular que ainda não congelaram, afetando as interações iônicas indispensáveis à regulação enzimática celular, além de que uma desidratação severa promove também a desnaturação das macromoléculas e o encolhimento excessivo das células até ocorrer colapso da membrana, demonstrando que

o estabelecimento de uma curva de congelação moderada, não tão rápida e não tão lenta, pode minimizar estes danos (HOLT, 2000; WOLFE & BRYANT, 2001).

Como resultado da criopreservação podem ocorrer dentre tantas, alterações drásticas na organização lipídica da membrana, podendo haver perda de proteínas, da motilidade espermática, funcionalidade do acrossomo que causa redução da qualidade do espermatozoide e capacidade de fertilização (WATSON, 1995; NARESH, 2016).

Durante a congelação, as membranas das células que estão em estado líquido cristalino são transformadas em gel na qual as cadeias de ácidos graxos são rearranjadas de maneira paralelas resultando em uma estrutura de membrana rígida (ordenada). A temperatura em que essas mudanças ocorrem variam com os tipos diferentes de lipídios e suas estruturas. Em geral, quando as cadeias de ácidos graxos são longas, a temperatura em que as membranas são submetidas a fase de transição é mais alta (PARKS, GRAHAM, 1992).

A congelação pode, ainda, causar danos ao citoesqueleto espermático uma vez que as membranas se sustentam no citoesqueleto dos espermatozoides, o qual é em parte, formado de proteínas actina, tubulina e proteínas associadas que são formas distintas expressas especificamente durante toda a espermatogênese ou apenas limitada à alguns estágios (FOUQUET & KANN, 1994). O citoesqueleto de actina é importante na manutenção da forma da célula normal e do movimento celular coordenado, sendo esses filamentos sensíveis as variações de temperatura e, a criopreservação das células pode causar remodelação dos filamentos de F-actina, com isso alterar a funcionalidade celular (CORREA et al., 2007; CARVALHO, 2018).

A regulação do volume celular espermático é vital para o sucesso da criopreservação (PETRUNKINA et al., 2005). A actina e α -tubulina são as principais proteínas do citoesqueleto, responsáveis pela regulação do volume celular (PEDERSEN et al., 2001). Um declínio importante na expressão de actina total e alterações nas locações de actina, mudanças de volume celular espermático e estrutural foram observados em espermatozoides bovinos criopreservados, prejudicando várias funções espermáticas levando a falhas na fertilização (FELIPE-PÉREZ et al., 2012).

A integridade do DNA espermático tem sido reportada como sendo tanto inalterada (EVENSON et al., 1994) quanto prejudicada após o processo de congelação (PERIS et al., 2004; CELEGHINI et al., 2008; WATERHOUSE et al., 2010; KHALIL et al., 2018). Celeghini e colaboradores (2008) observaram que a porcentagem da desnaturação da cromatina no sêmen criopreservado foi maior estatisticamente (1.02

$\pm 0.09\%$ e $1.2 \pm 0.1\%$, para os dois diluidores utilizados) que a observada no sêmen fresco diluído ($0.8 \pm 0.07\%$). Khalil et al. (2018) utilizando a técnica de SCSA para avaliar integridade de DNA e cromatina, observaram que a porcentagem de alterações na cromatina aumentou de acordo com o avanço nas etapas da criopreservação, começando com 2.8% de perda de integridade de cromatina no sêmen diluído, 3.8% no sêmen refrigerado (2 horas após atingir 4°C), 4.8% após 4 horas de período de equilíbrio a 4°C , atingindo 8.4% após a congelação/descongelação do sêmen, respectivamente. Já Januskauskas et al. (2003), utilizando laranja de acridina para avaliação da cromatina espermática, encontraram uma correlação significativa entre a porcentagem de células com desnaturação de DNA e reduzida integridade de membrana. As células consideradas mortas apresentaram correlação significativa com algumas variáveis do teste SCSA, como por exemplo, $\bar{x}\alpha_t$ que é a variável que mensura a extensão de desnaturação de DNA ($r= 0.53$) e $\text{COMP}\alpha_t$ que representa a porcentagem de células demonstrando desnaturação de DNA ($r= 0.58$). Ainda, os autores sugerem que essa correlação significativa pode indicar distúrbios na espermatogênese que afetam a estrutura da cromatina e também podem agir na membrana plasmática causando sua ruptura.

2.1.4 Etapa de descongelação

Por fim, após a congelação, segue-se para o momento de descongelação. Durante a descongelação dos espermatozoides criopreservados, os processos físicos que ocorrem durante a congelação serão revertidos. O sistema sólido derreterá parcialmente e as células serão novamente suspensas em soluções hipertônicas, que serão mais diluídas durante a descongelação (OZKAVUKCU; ERDEMLI, 2002).

A taxa de descongelação afeta significativamente a sobrevivência dos espermatozoides que foram congelados (PICKETT et al., 1965). Esta deve se desenvolver lentamente, evitando-se que grandes alterações no volume celular decorrentes da reidratação, causem lesões nas membranas espermáticas (WATSON, 1995; HOLT, 2000) e também rápida o suficiente para não permitir que a água intracelular descongele em um momento que a baixa temperatura presente permita a recristalização, caso isso ocorra, podem-se formar grandes cristais de gelo intracelulares predispondo as células ao risco de alterações (WATSON, 1995; HOLT, 2000). Na

maioria dos casos avaliados, taxas rápidas de descongelamento são geralmente melhores que taxas lentas de aquecimento (OZKAVUKCU; ERDEMLI, 2002).

Os crioprotetores penetrantes (glicerol) aumentam o volume da solução que não está congelada, reduzindo a concentração de sal presente e, como consequência causam menor desidratação. Todavia, os crioprotetores são menos permeáveis às membranas celulares que a água, induzindo grandes gradientes osmóticos transitórios através das membranas plasmáticas celulares quando adicionados antes da congelamento e removidos após a descongelamento, podendo lesar as células (GILMORE et al., 1998; GUTHRIE et al., 2002).

2.2 PLASMA SEMINAL

O plasma seminal é o fluido adicionado ao esperma durante o transporte epididimal e ejaculação; é produzido pelos epidídimos e glândulas sexuais acessórias (TROEDSSON et al., 2005, BURROUGHS et al., 2013).

Durante a monta natural, o plasma seminal ajuda a compensar o ambiente hostil que é o trato reprodutivo feminino e facilita o trânsito dos espermatozoides até o local de fertilização no oviduto (MAXWELL et al., 2007). Acredita-se também estar envolvido na regulação da capacitação espermática, reação acrossomal e interação espermatozoide-oócito (MANJUNATH & THERIEN, 2002). Ainda, facilita o armazenamento espermático no trato reprodutivo e identificação e imuno-reconhecimento do espermatozoide pela fêmea (TALEVI & GUALTIERI, 2010). Assim como a presença de algumas proteínas no plasma seminal é considerada benéfica para a função espermática, como motilidade (MANJUNATH; THÉRIEN, 2002), preservação da membrana plasmática durante o choque frio em carneiros (PÉREZ-PÉ et al., 2001), porém, deletéria para a preservação, incluindo a criopreservação (MANJUNATH; THÉRIEN, 2002). Além de que, o espermatozoide passa um intervalo relativamente curto no plasma seminal, mas ao processar os espermatozoides para a criopreservação ou sexagem, os espermatozoides podem passar horas diluídos no plasma seminal (BURROUGHS et al., 2013).

Stelletta e colaboradores (2014), citando Mann & Lutwak-Mann (1981), reportam que a composição do plasma seminal é determinada pelo tamanho, capacidade de armazenamento e produção secretória dos diferentes órgãos do trato reprodutivo masculino e pode ser modificada pelas enzimas seminais, metabolismo espermático e

interação entre constituintes seminais com a superfície espermática. Sua composição primária é de proteínas, açúcares e íons necessários para manter a “viabilidade” espermática, inibindo a capacitação, protegendo as membranas espermáticas e iniciando a motilidade dos espermatozoides (GARNER & HAFEZ, 2004; MOURA et al., 2007), e tem alta variabilidade individual em touros da raça Nelore (ASSUMPÇÃO et al., 2005).

No plasma seminal de bovinos existem as BSP's (proteínas ligadoras de fosfolipídios) que são produtos da secreção das glândulas vesiculares e representam cerca de 65% das proteínas totais no plasma seminal de touros (MANJUNATH et al., 2002). As BSP's interagem com o LDL (Lipoproteínas de Baixa Densidade) e essa interação aparenta ter um efeito significativo na preservação da integridade espermática (MANJUNATH et al., 2002; BERGERON et al., 2004), além disso, se ligam aos fosfolipídios de colina da membrana espermática durante a ejaculação e estimulam o efluxo de colesterol e fosfolipídios. No trato reprodutivo feminino, proteínas BSP ligadas ao espermatozoide interagem com os componentes do fluido do oviduto/folicular e estimulam um segundo efluxo de colesterol, resultando na capacitação espermática (MANJUNATH & THÉRIEN, 2002).

Entretanto, uma exposição sucessiva de espermatozoides ao plasma seminal, que contém proteínas BSP causa a remoção contínua do colesterol da membrana espermática, que pode tornar os espermatozoides muito sensíveis ao armazenamento no estado líquido ou congelado (BERGERON et al., 2004). Além de muitas doenças virais serem transmitidas através do plasma seminal, como por exemplo o vírus da diarreia bovina (MORRELL & RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2009). Ainda, em touros, o plasma seminal mostrou efeitos negativos sobre a integridade do acrossomo espermático *in vitro* (WAY et al., 2000).

No campo, em geral, o sêmen de touros é colhido por eletroejaculação. O ejaculado obtido por esse método difere em termos de quantidade e qualidade de plasma seminal daqueles ejaculados obtidos pelo uso de vagina artificial, alterando assim a proporção entre plasma seminal e espermatozoide, tendo geralmente um grande volume com baixa concentração (TIBARY et al., 1990; LÉON et al., 1991).

A técnica rotineiramente utilizada para a remoção e minimização dos efeitos deletérios do plasma seminal é a centrifugação, entretanto, sua intensidade e duração podem interferir negativamente na motilidade espermática, integridade de membrana plasmática e membrana acrossomal (RAMIRES-NETO et al., 2013; CAMPANHOLI et al., 2017).

A centrifugação é parte dos protocolos de rotina nas técnicas de sexagem espermática para obtenção da concentração espermática final desejada (JOHNSON, 2000). Borroughs e colaboradores (2013) relataram que a retirada do plasma seminal resultou em maior taxa de separação das células e maior porcentagem de células vivas orientadas ao final da sexagem. Também, a separação entre as populações de espermatozoides portadores de X e Y foi maior para os espermatozoides armazenados sem plasma seminal ($34 \pm 13\%$) do que para o grupo controle, com plasma ($10 \pm 13\%$). Após a descongelação, tanto motilidade total quanto progressiva foram maiores para as amostras sem plasma seminal (63.8% e 53.7%, respectivamente) quando comparadas com as controle (52.8% e 45.7%).

2.3 OBJETIVOS

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da ausência ou presença do plasma seminal sobre as características de membrana plasmática, acrossomal, potencial mitocondrial, remodelação dos filamentos de actina (F-actina) do citoesqueleto e fragmentação de cromatina em cada etapa da congelação do sêmen bovino (refrigeração, período de equilíbrio e congelação/descongelação).

REFERÊNCIAS

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoal. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987.

ARRUDA, R.P., **et al.** Manipulação e uso do sêmen transportado refrigerado de garanhões. In: II Simpósio de Equideocultura (SIMEQ), Viçosa. Anais do II Simpósio de Equideocultura (SIMEQ), p. 111-131, 2009.

ASSUMPÇÃO, T.I. **et al.** Correlation between fertility and levels of protein, sugar and free amino acids in seminal plasma of Nelore bulls. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 55-61, 2005.

BAILEY, J. L.; BILODEAU, J. F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 1–

7, 2000.

BERGERON, A. **et al.** Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology Reproduction**, v. 70, p. 708-717, 2004.

BORROUGHS, C.A. **et al.** Seminal plasma effects on sex-sorting bovine sperm. **Theriogenology**, v.79, p.551-557, 2013.

CAMPANHOLI, S.P. **et al.** Effect of seminal plasma removal before cryopreservation of bovine semen obtained by electroejaculation on semen quality and in vitro fertility. **Theriogenology**, v. 89, p. 114-121, 2017.

CARVALHO, C.P.T. **Avaliação do processo de congelação do sêmen equino in natura diluído, 5°C, -55°C e pós-descongelação.** 2018. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

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, p. 119-131, 2008.

CORREA, L.M.; THOMAS, A.; MEYERS, A.S. The macaque sperm actin cytoskeleton reorganizes in response to osmotic stress and contributes to morphological defects and decreased motility. **Biology of reproduction**, v. 77, n. 6, p. 942-953, 2007.

DAHMI, A.J.; SAHNI, K.L. Evaluation of different cooling rates, equilibration periods and diluents for effects on deep-freezing, enzyme leakage and fertility of taurine bull spermatozoa. **Theriogenology**, v. 40, p. 1269-1280, 1993.

DE LEEUW, F.E. **et al.** Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. **Cryobiology**, v. 27, p. 171-183, 1990.

DOUGLAS-HAMILTON, D.H., **et al.** A field study of fertility of transported equine semen. **Theriogenology**, v.22, n.3, p.291-304, 1984.

DROBNIS, E.Z., **et al.** Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. **Journal of Experimental Zoology**, v. 265, p. 432-437, 1993.

- EVENSON, D.P.; THOMPSON, L.; JOST, L. Flow cytometric evaluation of boar semen by Sperm Chromatin Structure Assay as related to cryopreservation and fertility. **Theriogenology**, v. 41, p. 637–651, 1994.
- FELIPE-PÉREZ, Y.E. **et al.** Volume regulatory function and sperm membrane dynamics as parameters for evaluating cryoprotective efficiency of a freezing extender. **Cryobiology**, v. 64, p. 103-109, 2012.
- FLEISCH, A. **et al.** Effects of an extension of the equilibration period up to 96 hours on the characteristics of cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v. 89, p. 255-262, 2017.
- FOOTE, R.H.; KAPROTH, M. Large batch freezing of bull semen: effect of time of freezing and fructose on fertility. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 453-456, 2002.
- FOUQUET, J.P.; KANN, M.L. The cytoskeleton of mammalian spermatozoa. **Biology of the Cell**, v. 81, n. 2, p. 89-93, 1994.
- GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozoide e plasma seminal. In: Hafez, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7. Ed. Barueri: Manoele Ltda, c. 7, p. 97-110, 2004.
- GAO, D.; MAZUR, P.; CRITSER, J.K. Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoal. **Reproductive Tissue Banking**, p. 263-328, 1997.
- GAO, D.; CRITSER, J.K. Mechanisms of cryoinjury in living cells. **ILAR Journal**, v. 41, n. 4, p. 187-196, 2000.
- GILMORE, J.A. **et al.** Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoal and their relevance to cryopreservation. **Biology Reproduction**, v. 58, p. 28-36, 1998.
- GRAHAM, J.K. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculates spermatozoal of the ram and the bull during the cryopreservation process. **Theriogenology**, v. 41, p. 1151-1162, 1994.
- GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 12, n. 1, p. 131-147, 1996.

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

GUTHRIE, H.D.; LIU, J.; CRITSER, J.K. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoal. **Biology Reproduction**, v. 67, p. 1911-1816, 2002.

HALL, S.M.; EVANS, J.; HAWORTH, S.G. Influence of cold preservation on the cytoskeleton of cultured pulmonary arterial endothelial cells. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 9, p. 106–114, 1993.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, K.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, n. 1, p. 73-88, 1990.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUES-MARTINEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology**, v. 60, p. 743-758, 2003.

JOHANNISSON, A. **et al.** Simultaneous evaluation of superoxide content and mitochondrial membrane potential in stallion semen samples provides additional information about sperm quality. **Animal Reproduction Science**, v. 192, p. 290-297, 2018.

JOHNSON, L.A. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. **Animal Reproduction Science**, v. 61, p. 93-107, 2000.

KHALIL, W.A. **et al.** Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 6, p. s49-s56, 2018.

LEITE, T.G. **et al.** Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, v. 120, p. 31-38, 2010.

LEMMA, A. Effect of cryopreservation on sperm quality and fertility. **Artificial**

Insemination in Farm Animals, p. 191-216, 2011.

LEÓN, H. **et al.** Effect of the collection method on semen characteristics of Zebu and European type cattle in the tropics. **Theriogenology**, v. 36, p. 349–55, 1991.

LOVE, C.C.; BRISKO, S.P.; RIGBY, S.L.; THOMPSON, J.A.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. **Theriogenology**, v. 63, p. 1584-1591, 2005.

MANJUNATH, P.; THERIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, p. 109-119, 2002.

MANJUNATH, P. **et al.** Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biology Reproduction**, v. 67, p. 1250–1258, 2002.

MAXWELL, W.M. **et al.** Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. **Society of reproduction and Fertility Supplement**, v. 64, p. 13-38, 2007.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 247, n. 3, p. C125-C142, 1984.

MEDEIROS, C.M.O. **et al.** Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 327-344, 2002.

MORAN, D.M. **et al.** Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 38, p. 999-1012, 1992.

MORRELL, J.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Biomimetic techniques for improving sperm quality in animal breeding: a review. **The Open Andrology Journal**, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2009.

MORRIS, G.J.; ACTON, E. Controlled ice nucleation in cryopreservation-a review. **Cryobiology**, v. 66, n. 2, p. 85-92, 2013.

MOURA, A.A., **et al.** A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 169-188, 2007.

MUIÑO, R.; FERNÁNDEZ, M.; PEÑA, A.I. Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 42, p. 305-311, 2007.

MURPHY, E.M. **et al.** Effect of increasing equilibration time of diluted bull semen up to 72 h prior to freezing on sperm quality parameters and calving rate following artificial insemination. **Theriogenology**, v. 108, p. 217-222, 2018.

NARESH, S. Effect of cooling (4°C) and cryopreservation on cytoskeleton actin and protein tyrosine phosphorylation in buffalo spermatozoa. **Cryobiology**, v. 72, n. 1, p. 7-13, 2016.

OZKAVUKCU, S.; ERDEMLI, E. Cryopreservation: basic knowledge and biophysical effects. **Journal of Ankara medical school**, v. 24, n. 4, p. 187-196, 2002.

PAPA, P.M. **et al.** Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen. **Theriogenology**, v. 83, p. 107-113, 2015.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 210-223, 1992.

PEDERSEN, S.F.; HOFFMANN, E.K.; MILLS, J.W. The cytoskeleton and cell volume regulation. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 130, p. 385-399, 2001.

PEÑA, F.J. **et al.** Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: the way to improve current cryopreservation protocols? **Theriogenology**, v. 76, n. 7, p. 1177-1186, 2011.

PÉREZ-PÉ, R. **et al.** Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 56, p. 425-434, 2001.

PERIS, S.I., **et al.** Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. **Journal of Andrology**, v. 25, p. 224-233, 2004.

PETRUNKINA, A.M., **et al.** Volume regulatory function and sperm membrane dynamics as parameters for evaluating cryoprotective efficiency of a freezing extender. **Theriogenology**, v. 63, p. 1390-1406, 2005.

PICKETT, B. W., **et al.** Investigations on Thawing Frozen Bovine Spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v.16, n. 5, p. 642–651, 1965.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; AND PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v.164, p. 666, 1949.

RAMIRES NETO, C. **et al.** Effect of removing seminal plasma using a Sperm Filter on the viability of refrigerated stallion semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, p. 40-43, 2013.

ROYERE, D. **et al.** Cryopreservation of spermatozoa: A 1996 review. **Human Reproduction**, v.2, p. 553–559, 1996.

SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W. F. Sperm membrane behavior during cooling and cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.50, n.S3, p.20-26, 2015.

SIQUEIRA, A.F.P. **et al.** Sperm traits on in vitro production (IVP) of bovine embryos: too much of anything is good for nothing. **Plos One**, v.13, n.7, p.16, 2018.

SQUIRES, E.L. **et al.** Cooled and frozen stallion semen. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, v. 9, p.1-38, 1999.

STELLETTA, C.; OZTUTAR, F.; VENCATO, J. Comparative Biochemical Composition of Seminal Plasma and its Clinical Usefulness. In: Proceedings, Association for Applied Animal Andrology, 9th Biennial Conference of the Association for Applied Animal Andrology, Newcastle, p. 119-131, 2014.

TALEVI, R.; GUALTIERI, R. Molecules involved in sperm-oviduct adhesion and release. **Theriogenology**, v. 73, p. 796-801, 2010.

TIBARY, A. **et al.** Effect of dialysis or centrifugation on post-thaw motility and fertility of Santa Gertrudis bull semen collected by electroejaculation. **Theriogenology**, v. 33, p. 733-739, 1990.

THUN, R.; HURTADO, M.; JANETT, F. Comparison of Biociphos-Plus® and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. **Theriogenology**, v. 57, p. 1087-1094, 2002.

TROEDSSON, M.H.T. **et al.** Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 171-186, 2005.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1 (3), p. 23-53, 2000.

WATERHOUSE, K.E. **et al.** Alterations of sperm DNA integrity during cryopreservation procedure and in vitro incubation of bull semen. **Animal Reproduction Science**, v. 117, p. 34-42, 2010.

WATSON, P. F. The preservation of semen in mammals. In: FINN, C. A. **Oxford reviews of reproductive biology**. New York: Oxford Univ Press., v. 1, p. 283-330, 1979.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, n. 4, p. 871-891, 1995.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal reproduction science**, v. 60, p. 481-492, 2000.

WAY, A.L.; GRIEL JR, L.C.; KILLIAN, G.J. Effects of accessory sex gland fluid on viability, capacitation, and the acrosome reaction of cauda epididimal bull spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 213-219, 2000.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. **International Journal of Refrigeration**, v. 24, p. 438-450, 2001.

3 EFEITO DA PRESENÇA E AUSÊNCIA DO PLASMA SEMINAL NAS DIFERENTES ETAPAS DO PROCESSO DE CONGELAÇÃO DO SÊMEN BOVINO

3.1. INTRODUÇÃO

Na reprodução bovina, a inseminação artificial é a ferramenta mais amplamente aplicada, facilitando assim a utilização extensiva do espermatozoide criopreservado (GRAVANCE et al., 1998). O processo de criopreservação é resultado do conjunto de etapas que normalmente compreendem a diluição, refrigeração, período de equilíbrio, congelação incluindo o *supercooling*, e descongelação das células espermáticas.

Diferentemente de outras células do corpo, os espermatozoides deveriam ser menos sensíveis aos danos que a criopreservação causa por possuírem menor quantidade de água e alta fluidez de membranas (UGUR et al., 2019). Entretanto, os procedimentos para preservação espermática nem sempre são eficientes, já que elevado número de espermatozoides sofrem danos após a congelação e descongelação, levando à redução da fertilidade (BAILEY et al., 2000).

Segundo Baust e colaboradores (2009) existem fatores estressantes que influenciam as células durante as etapas de refrigeração e congelação. Na etapa de refrigeração, as células são expostas a muitos efeitos deletérios incluindo dissociação metabólica, desequilíbrio iônico, ativação de proteases, acidose celular, privação de energia, fase de transição de membranas, desestabilização do citoesqueleto, produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS). Já na etapa de congelação, os espermatozoides estão predispostos a efeitos deletérios advindos da formação de cristais de gelo, hiperosmolaridade, alterações no volume celular e desnaturação proteica, além de fragmentação de cromatina (PERIS et al., 2004).

Os danos sofridos pela membrana plasmática são a principal causa de lesões celulares. Inicialmente, assumiu-se que o choque frio estava relacionado com a composição da bicamada lipídica da membrana (WATSON, 1995). Quando a temperatura é reduzida durante o processo de refrigeração, restrições do movimento lateral de fosfolipídios induzem uma mudança de fase líquida para de gel, fazendo com que a membrana se torne mais rígida e frágil. As mudanças de fase da membrana levam à separação lipídica e à agrupamentos irreversíveis das proteínas (DE LEEUW, 1990). Ademais, do estabelecimento de canais que permitem a entrada de íons e pequenas

moléculas, que como consequência causam aumento da permeabilidade da membrana, desestabilizando-a e levando a danos e perda de viabilidade (SIEME et al., 2015; GRÖTTER et al., 2019).

Após a refrigeração, os espermatozoides são mantidos entre 6 e 4°C por tempo determinado, que é denominado período de equilíbrio. Existem controvérsias sobre a necessidade e duração desta etapa na criopreservação do sêmen, podendo variar de 0 minutos até 96 horas antes da congelação (DAHMI et al., 1993; MUIÑO et al., 2007; LEITE et al., 2010; FLEISCH et al., 2017; MURPHY et al., 2018). Pesquisadores apontam vários benefícios com o uso do período de equilíbrio em relação a motilidade, integridade de membranas e função mitocondrial das células espermáticas, por acreditarem ser importante para a adaptação das membranas espermáticas a baixas temperaturas, possibilitando a translocação da água, diminuindo lesões que possam ser causadas pela nucleação do gelo durante a congelação e descongelação (DAHMI et al., 1993; LEITE et al., 2010; FLEISCH et al., 2017; MURPHY et al., 2018).

Em seguida, inicia-se o processo de congelação, onde ocorre a formação de uma fina camada de gelo em torno da célula espermática, devido ao ponto de fusão do crioprotetor e do líquido intracelular serem abaixo de 0°C (MAZUR, 1984). Quando a temperatura fica abaixo do ponto de congelação e antes que haja a formação de cristais de gelo, ocorre um fenômeno chamado *supercooling* (MORRIS & ACTON, 2013), que é o momento em que o soluto passa por uma redução de temperatura abaixo do ponto de solidificação do meio e antes da nucleação do gelo extracelular começar, com isso, provocando aumento na temperatura por liberação de calor latente, que é necessário para a cristalização (DILLER, 1975; OZKAVUKCU & ERDEMLI, 2002; MORRIS & ACTON, 2013). Logo após a nucleação, os cristais de gelo começam a se formar com o retorno da temperatura ao seu ponto de fusão, ocorrendo liberação de calor (OZKAVUKCU & ERDEMLI, 2002).

Como resultado da congelação podem ocorrer alterações drásticas na organização lipídica da membrana, como perda de proteína, de motilidade e funcionalidade do acrossomo que causa redução da qualidade do sêmen e capacidade de fertilização (WATSON, 1995; NARESH, 2016).

Por fim, após a congelação dos espermatozoides, esses agora passam pelo processo de descongelação, na qual, são expostos a um ambiente hipotônico, resultando em aumento de volume celular devido ao influxo de água do citoplasma. Os danos celulares ocorrem principalmente devido ao estresse hiperosmótico durante a congelação,

resultando em desidratação celular e ao estresse hiposmótico durante a descongelamento que causa inchaço celular (PEÑA et al., 2012). Além de relatado por Castro e colaboradores (2016) que a estrutura da cromatina é prejudicada principalmente na fase de descongelamento.

A actina é uma das principais proteínas do citoesqueleto, responsável pela regulação do volume celular (PEDERSEN et al., 2001) e embora a remodelação dos filamentos de actina do citoesqueleto seja importante para a mobilidade e determinação da forma da célula (SMALL et al., 1999), a criopreservação pode causar modificações definitivas nas redes de filamentos de actina (HALL et al., 1993) bem como, no volume celular e estrutural (FELIPE-PÉREZ et al., 2012). A presença de actina na cauda do espermatozoide é importante para a regulação da motilidade espermática, e sua localização na cabeça entre a membrana plasmática e a membrana acrossomal externa, em várias espécies de mamíferos, sugere que tenha importante papel na capacitação e reação acrossomal (BREITBART et al., 2005, CABELLO-AGUEROS et al., 2003). Portanto, sugere-se que quanto menos remodelação dos filamentos de actina ocorra durante a criopreservação, menos alterações e danos aos espermatozoides o processo está causando.

A integridade do DNA e estrutura de cromatina foram identificadas como fatores cruciais para a capacidade do espermatozoide suportar o processo de criopreservação e apoiar o desenvolvimento embrionário (AGARWAL et al., 2009). Entretanto, vários fatores mecânicos, fisiológicos e químicos podem deteriorar a integridade da cromatina. Segundo Evenson (2016), há evidências sugerindo que o núcleo espermático com cromatina alterada fornece informações adicionais sobre os danos causados pela congelação/descongelação que causam alterações incluindo a desnaturação, assim como Peris et al, (2004), Celeghini et al. (2008), Waterhouse et al. (2010) e Khalil et al. (2018) revelaram integridade de cromatina prejudicada no processo de congelação.

Além das lesões que o processo de criopreservação causa aos espermatozoides, há também os efeitos do plasma seminal sob a criopreservação. Existem controversas quanto esses efeitos, podendo ser benéficos quanto a “proteger” os espermatozoides dentro do sistema reprodutivo feminino e auxiliar na capacitação espermática (PÉREZ-PÉ et al., 2001; MANJUNATH & THÉRIEN, 2002) ou deletérios quando relacionados à sobrevivência dos espermatozoides bovinos durante o armazenamento, criopreservação ou sexagem espermática (GRAHAM, 1994; MAXWELL et al., 1997; GARNER & HAFEZ, 2004). Componentes do plasma seminal alteram a membrana plasmática

espermática e tem sido implicado na facilitação da capacitação e da reação acrossomal. Não somente isso, em touros, o plasma seminal mostrou efeitos negativos sobre a motilidade bem como a integridade do acrossomo espermático *in vitro* (WAY et al., 2000). Estudos mostraram que a composição do plasma seminal apresenta grande variabilidade individual em touros da raça Nelore, o que resulta em diferentes respostas dos animais à criopreservação (MARTINUS et al., 1991; ASSUMPÇÃO et al., 2005).

Muito já se estudou sobre as etapas do processo de criopreservação de espermatozoides bovinos, entretanto, todos os trabalhos dos quais temos conhecimento, estudaram tais etapas individualmente, refrigeração (CRESPILO et al., 2012; NARESH et al., 2016; DIAS et al., 2018), período de equilíbrio (MUIÑO et al., 2007; LEITE et al., 2010; FLEISCH et al., 2017), congelação/descongelação (NAGY et al., 2004; BÜYÜKLEBLEBICI et al., 2014). E dos trabalhos que temos conhecimento que estudaram mais de uma etapa concomitantemente (JONES; STEWART, 1979; DAHMI, 1993; NARESH, 2016; DIAS et al., 2018; KHALIL et al., 2018; CARVALHO, 2018), não avaliaram o efeito do plasma seminal no mesmo.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da presença e ausência do plasma seminal sobre as características de membrana plasmática, acrossomal, potencial mitocondrial, remodelação dos filamentos de actina (F-actina) do citoesqueleto e fragmentação de cromatina em cada etapa da criopreservação do sêmen bovino (refrigeração, período de equilíbrio e congelação/descongelação), bem como o efeito dessas etapas sobre as características espermáticas acima.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Animais e colheita do sêmen

Foram utilizados 7 touros da raça Nelore de 2,2 a 5,5 anos de idade e colhidos 6 ejaculados de cada animal, com exceção de 1 touro (5 colheitas), (n =41). Os touros foram mantidos em 2 piquetes sob mesmas condições de pastejo, com suplementação mineral e concentrado, água *ad libitum*. Previamente a cada colheita, o prepúcio e o pênis foram higienizados com 1 litro de Ringer com Lactato. O sêmen foi colhido por eletroejaculação (Autojac V3[®], Neovet Products for Animal Reproduction, Uberaba, MG- Brazil). Os procedimentos realizados neste experimento estão de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ/USP, n° do protocolo 2161020817.

3.2.2 Avaliação e centrifugação do sêmen

Logo após a colheita, as características seminais foram avaliadas, sendo que: volume do ejaculado foi determinado diretamente no tubo graduado de 15mL usado na colheita. A motilidade (%) e vigor (1-5) espermáticos foram avaliados subjetivamente sob microscópio de contraste de fase equipado com platina aquecedora (37°C) em aumento de 100x. Em seguida, a concentração espermática foi avaliada da seguinte maneira: uma alíquota de sêmen foi diluída em formol salino 4% na diluição de 1:100 e as células foram contadas em câmara de Neubauer sob microscopia óptica (400x). Após as avaliações, o sêmen foi diluído (1:1) em meio de congelação (BotuBov[®], Botupharma Biotecnologia Animal, Botucatu, São Paulo, Brasil) e então dividido em duas alíquotas iguais sendo que, uma das alíquotas teve sua concentração ajustada para 100×10^6 sptz/mL (tratamento PS= com plasma seminal) e a outra alíquota foi centrifugada (tratamento SPS= sem plasma seminal) a 500 x g por 12 minutos (Excelsa II 206-BL[®] FANEM Ltda, São Paulo/SP, Brasil), resuspendida em diluidor BotuBov[®] e a concentração reajustada para 100×10^6 sptz/mL.

3.2.3 Criopreservação do sêmen

Após as análises iniciais em temperatura ambiente, ambas alíquotas (PS= com plasma seminal e SPS= sem plasma seminal) foram envasadas em palhetas de 0,5mL (IMV Internacional, St. Paul, Minnesota, USA) e colocadas em máquina de criopreservação automática (TK 3000[®], TK Tecnologia em Congelação Ltda, Uberaba, MG, Brasil) cujo sistema de porta-palhetas para congelação é vertical, sendo possível remover palhetas sem parar ou haver interferência no processo, como realizado em pré experimento. A máquina foi pré-ajustada com curva de refrigeração de -0,25°C/min de 22°C a 5°C, uma hora de período de equilíbrio a 5°C e curva de congelação de -20°C/min de 5°C a -120°C. Ao atingir -120°C as palhetas foram mergulhadas para nitrogênio líquido a -196°C. As amostras (PS e SPS) foram avaliadas nos seguintes momentos: M1= \pm 22°C, M2= 5°C, M3= após completar uma hora em período de equilíbrio a 5°C, M4= pós-descongelação.

3.2.4 Análises funcionais do sêmen com e sem plasma seminal

Para cada análise realizada duas palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos, com a máquina realizando a curva de congelamento, sem nenhum prejuízo para os resultados, como previamente testado (CARVALHO, 2018). Os momentos de avaliações estão representados na figura 1.

3.2.4.1 Avaliação da integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial

Para a avaliação de integridade de membranas e potencial mitocondrial foi utilizada adaptação do método descrito em Celeghini (2007). O sêmen foi diluído em meio TALP *sperm* na concentração espermática de 10×10^6 sptz/mL com volume final de 150 μ L na qual foram adicionados: 2 μ L de Hoescht 33342 (0.5 mg/mL, Molecular Probes), 2 μ L de iodeto de propídio (0,5mg/mL, Sigma-Andrich), 6 μ L de 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1, 153 μ M, Sigma-Andrich) e 50 μ L de aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA, 100 μ g/mL, Sigma-Andrich). Após incubação da amostra no escuro por 8 minutos a leitura era realizada com uma lâmina de gota úmida de 3 μ L pré-aquecida a 37°C, em aumento de 1000x em microscopia de epifluorescência (Nikon, Modelo Eclipse Ni-U 80i, Tóquio, Japão) utilizando-se o filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380nm e emissão 435-485nm), B-2E/C (excitação 465-495nm e emissão 515-555nm) e G-2E/C (excitação 540-525nm e emissão 605-655nm). Foram contadas 200 células e classificadas de acordo com os padrões de fluorescência emitidos considerando as seguintes categorias: porcentagem de células com membranas plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA); porcentagem de células com membrana plasmática íntegra (MPI); porcentagem de células com alto potencial de membrana mitocondrial (APM) e porcentagem de células com membrana acrossomal intacta (AI).

3.2.4.2 Avaliação da remodelação dos filamentos de actina do citoesqueleto espermático

Para visualização da remodelação dos filamentos de actina foi utilizado protocolo adaptado de Brener *et al.* (2003) e García *et al.* (2012), empregando a sonda fluorescente

Faloidina conjugada com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC-Faloidina; 0,2 mM, Sigma-Aldrich, P5282). As amostras de sêmen foram diluídas em Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS-Biodux[®], São Paulo, Brasil) para uma concentração de 50×10^6 spz/mL e realizados esfregaços em lâminas de microscópio previamente tratadas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, P4707). A fixação foi feita com formaldeído em 5% por 10 minutos, lavagem com DPBS, permeabilizadas em acetona refrigerada (LiChrosolv[®]P/HPLC-Merck) por 10 minutos e secas ao ar por mais 10 minutos, depois da secagem, reidratadas em Solução Salina Tamponada com Tris (TBS, 10x; Sigma-Aldrich, T5912-1L) contendo 1% de BSA por 10 minutos. Após esse processo, em local protegido da luz, as lâminas foram coradas com 5 μ L de faloidina conjugada com FITC (2 mM), colocadas sob lamínulas (24x60mm) e incubadas por uma hora. As lâminas foram analisadas com base nos padrões de intensidade de brilho localizado na região pós-acrossomal conforme descritos por Peña *et al.* (2011), no aumento de 1000x sob microscopia de epifluorescência (Nikon, Modelo Eclipse Ni-U 80i, Tóquio, Japão) utilizando-se o filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380nm e emissão 435-485nm), B-2E/C (excitação 465-495nm e emissão 515-555nm) e G-2E/C (excitação 540-525nm e emissão 605-655nm) onde 200 células por lâmina foram contadas.

3.2.4.3 Avaliação da fragmentação da cromatina espermática

Para esta avaliação 15 μ L de amostra de sêmen a 50×10^6 spz/mL foram adicionadas de 1000 μ L de tampão TNE (10mM Tris-HCl, 0,15M NaCl, 1mM EDTA dissódico pH = 7,4) e congeladas em freezer -20°C para posterior análise, de acordo com trabalhos descritos (CASTRO *et al.*, 2016; SIQUEIRA *et al.*, 2018). No momento das análises, as amostras foram descongeladas, lavadas por centrifugação duas vezes a 1000 g/ 5 minutos. Após a lavagem o sedimento foi ressuspensionado em 50 μ L de tampão TNE e então foi adicionada a solução de detergente ácido (0,08M HCl, 0,15M NaCl, 0,1% (v/v) Triton X-100, pH = 1,4). Após exatos 30 segundos, foi adicionada a solução de laranja de acridina (6 μ g/mL in 0,1M ácido cítrico, 0,2M Na₂HPO₄, 1mM de EDTA, 0,15M NaCl, pH 6,0) e após 5 minutos de incubação as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo Guava EasyCyte[™] Mini System (Guava[®] Technologies, Hayward, CA, EUA) com laser de argônio em excitação de 20mW 488nm. Foram adquiridos 20.000 eventos por amostra. Os eventos referentes aos espermatozoides foram identificados e selecionados

com *gate* retangular em gráfico tipo *dotplot* da fluorescência verde *versus forward scatter*, ambos em amplificação logarítmica. Em seguida, a determinação dos eventos positivos e negativos foi realizado por meio de ferramenta bi setorial em gráfico tipo histograma do parâmetro derivado Alfa TYlog. Este parâmetro derivado é o resultado da fluorescência amarela dividida pela fluorescência total (somatória da fluorescência amarela e verde). Para determinar os *gates* de seleção de espermatozoides e a classificação dos eventos positivos e negativos, seis amostras escolhidas aleatoriamente foram utilizadas para validação. Cada uma dessas amostras foi dividida em duas partes iguais controle positivo e negativo. O controle negativo foi analisado com o protocolo padrão. O controle positivo foi submetido ao protocolo padrão, porém com detergente ácido modificado (1,2M HCl, 0,15M NaCl, 0,1% (v/v) Triton X-100, pH = 0,1). Após a coloração do controle negativo e positivo, foi realizada a mistura dos dois controles nas proporções 1:3 ou 25% positivo; 1:1 ou 50% positivo e 3:1 ou 75% positivo. As análises foram realizadas pela técnica de citometria de fluxo. Para isto, os *gates* finais adotados e aplicados a todas as amostras deste estudo foram aqueles que apresentaram maior coeficiente de determinação (R^2) na validação. Das seis amostras utilizadas na validação, 4 apresentaram $R^2 > 0,99$, um apresentou $R^2 = 0,98$ e outro apresentou $R^2 = 0,95$, indicando a alta precisão da metodologia na identificação dos espermatozoides entre os eventos adquiridos e na determinação dos espermatozoides com cromatina desnaturada.

3.2.5 Análise estatística

Os dados obtidos após os procedimentos experimentais foram analisados com auxílio do *software Statistical Analysis System for Windows SAS*[®], versão 9.3 (SAS, 2005). Inicialmente, a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE) foi verificada. As variáveis que não atenderam as premissas estatísticas de distribuição normal foram transformadas para log [Log (X+1)] ou ranqueadas. Os dados originais ou transformados, foram submetidos à análise de variância através de modelo misto (PROC MIXED, SAS) considerando medidas repetidas no tempo através do comando REPEATED.

Uma segunda análise foi realizada para explorar as mudanças relativas ocorridas em cada momento (tempo) do processamento do sêmen conforme as etapas experimentais. Assim, a proporção (%) de mudança (redução ou aumento) de cada variável foi calculada em cada tempo. Para isso, os dados foram submetidos à análise de

variância através de modelo misto (PROC MIXED, SAS), utilizando as seguintes fórmulas: $E1 = M2/M1 \times (100) - 100$ (período de refrigeração); $E2 = M3/M2 \times (100) - 100$ (período de equilíbrio); $E3 = M4/M3 \times (100) - 100$ (período de congelamento e descongelamento). Comparações envolvendo mais de uma média foram realizadas pelo teste de Tukey. Foi considerada diferença significativa entre as variáveis testadas quando $P < 0,05$.

3.3. RESULTADOS

Os resultados obtidos dos efeitos da presença ou ausência do plasma seminal sobre a integridade de membranas plasmática (MPI), acrossomal (AI), potencial mitocondrial (APM), células com membrana plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial mitocondrial (PIAIA), remodelação dos filamentos de actina (F-actina) do citoesqueleto e fragmentação de cromatina em cada etapa avaliada do processo de congelamento (refrigeração= de $\pm 22^{\circ}\text{C}$ a 5°C ; período de equilíbrio= de 5°C a 5°C^* e congelamento/descongelamento= de 5°C^* a -196°C) estão descritos na Tabela 1.

Nas figuras 2 e 4, estão representadas as médias das porcentagens das características de membranas avaliadas e da remodelação dos filamentos de F-actina em cada etapa do processo de congelamento, respectivamente.

As médias de espermatozoides com integridade acrossomal dos tratamentos PS e SPS, estão representadas na figura 3 e da remodelação dos filamentos de F-actina do citoesqueleto, estão representadas na figura 7.

As médias das reduções de porcentagem, ou seja, a porcentagem de lesão que cada etapa do processo de congelamento causou individualmente nos espermatozoides quanto as características de membranas (MPI, AI, APM e PIAIA) estão representadas na figura 4, bem como, quanto a remodelação dos filamentos de F-actina do citoesqueleto, estão representadas na figura 6.

Obs: 5°C^* = foi utilizado para diferenciar o período de equilíbrio de 1 hora a 5°C do final do período de refrigeração ($\pm 22^{\circ}\text{C}$ a 5°C), no qual a avaliação foi realizada assim que a máquina atingiu 5°C , na tabela e nos gráficos.

3.3.1. Avaliação da integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial espermático nas etapas do processo de congelação

Os resultados obtidos mostram que a presença do plasma seminal (PS) preservou melhor a integridade acrossomal durante o processo de congelação que a sua ausência (75.2 e 71.7%, respectivamente) (Figura 3). Entretanto, não foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos PS e SPS em nenhum momento avaliado (Tabela 1).

Também foi possível observar que a integridade acrossomal foi a que melhor resistiu ao processo de congelação, finalizando à descongelação com 50.6% de integridade (Figura 2, B).

Notou-se gradativa diminuição de integridade de membrana plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial, bem como de espermatozoides PIAIA ao longo do processo de congelação. Observou-se que após a descongelação, apenas 16.9% dos espermatozoides tinham membrana plasmática íntegra (Figura 2, A). Não houve diferença significativa entre 5°C e 5°C* tanto para a integridade de membrana plasmática quanto para espermatozoides PIAIA. (Figura 2, A e D).

Pudemos observar uma discreta diferença significativa ($P < 0.05$) após o período de equilíbrio para integridade de acrossomo e potencial de membrana mitocondrial, mostrando que houveram lesões aos espermatozoides durante o período de equilíbrio (78.4% e 76.3%; 55.1% e 51.2%, respectivamente) demonstrados na figura 2 (B e C).

Os resultados mostraram que a etapa de congelação/dcongelação isoladamente, foi responsável pela maior parte de lesões causadas aos espermatozoides para todas as características de membranas avaliadas (MPI, AI, APM e PIAIA) (-61.4%, -34.0%, -48.1% e -64.7%, respectivamente), em seguida a refrigeração (-27.3%, -11.4%, -20.2% e -28.7%, respectivamente) e por fim, a etapa que menos levou à lesões aos espermatozoides foi o período de equilíbrio (Figura 4).

3.3.2. Avaliação da remodelação dos filamentos de actina do citoesqueleto espermático nas etapas do processo de congelação

Observamos que de forma geral, a presença do plasma seminal (PS) preveniu melhor a remodelação dos filamentos de actina do citoesqueleto durante o processo de congelação que a sua ausência (SPS) (29.9% e 32.4%, respectivamente) (Figura 7).

Entretanto, não encontramos diferença significativa entre os tratamentos PS e SPS em nenhum momento avaliado ainda que tenha havido diferença numérica (Tabela 1).

Quando as etapas do processo de congelamento foram avaliadas individualmente, observamos que a refrigeração foi a etapa que mais causou remodelação de F-actina (56.3%), depois foi o período de equilíbrio (32.2%) e por fim, a etapa que menos causou remodelação foi a congelamento/descongelamento (23.9%) (figura 6).

É possível notar aumento progressivo na remodelação de F-actina ao longo do processo de congelamento que ao final do mesmo, apresentou 42.7% de remodelação, bem como encontramos diferença significativa aos 5°C* em relação a $\pm 22^{\circ}\text{C}$ e 5°C (35.1%, 27.9% e 19.0%, respectivamente), demonstrando que o período de equilíbrio também promoveu remodelação dos filamentos de actina (Figura 5).

3.3.3. Avaliação da fragmentação da cromatina espermática nas etapas do processo de congelamento

Não encontramos efeito da presença (PS) ou ausência do plasma seminal (SPS) sobre a fragmentação de cromatina em nenhuma etapa avaliada do processo de congelamento. Além disso, também não houve diferença estatística entre nenhuma etapa do processo sobre a indução de fragmentação de cromatina nos espermatozoides (Tabela 1).

3.4 DISCUSSÃO

No presente trabalho, estudamos os efeitos da presença e da ausência do plasma seminal sobre as características de membranas plasmática, acrossomal, potencial mitocondrial, remodelação dos filamentos de actina (F-actina) do citoesqueleto e fragmentação de cromatina em cada etapa do processo de congelamento do sêmen bovino. Utilizamos o protocolo clássico automatizado que é rotineiramente utilizado para a congelamento do sêmen bovino a campo.

Embora existam controvérsias quanto aos efeitos do plasma seminal sobre os espermatozoides, podendo ser benéficos (PÉREZ-PÉ et al., 2001; MANJUNATH & THÉRIEN, 2002) ou deletérios (GRAHAM, 1994; MAXWELL et al., 1997; WAY et al., 2000; GARNER & HAFEZ, 2004; CAMPANHOLI et al., 2017), em nosso trabalho, não encontramos diferença significativa entre a presença ou ausência do plasma seminal nas características espermáticas avaliadas, exceto pelas médias gerais de integridade de

membrana acrossomal e remodelação de F-actina, na qual, durante o processo de congelação o tratamento com plasma seminal (PS) obteve maiores médias gerais que o tratamento sem plasma seminal (SPS) em todos os tempos para ambas as características avaliadas, ou seja, a presença do plasma seminal preservou melhor a integridade acrossomal e causou menor remodelação dos filamentos de F-actina do citoesqueleto durante o processo de congelação do que a ausência do plasma seminal. Desta forma, nosso trabalho contrapõe os de Pérez-Pé et al. (2001) que ao adicionar previamente proteínas do plasma seminal à espermatozoides de carneiros submetidos ao choque-frio induzido, obtiveram efeito benéfico imediato na integridade de membrana dos espermatozoides, sendo essa concentração de proteínas dependente, mostrando que as proteínas do plasma seminal absorvidas nas membranas espermáticas previnem a redução da permeabilidade da membrana, isso poderia ser atribuído à habilidade dos ácidos graxos ampliarem as fases de transição e impedir a fase de separação lateral dos lipídios. Assim como, o trabalho de Okazaki e colaboradores (2009), mostrou que a congelação de espermatozoides de cachacos com baixa congelabilidade, sem plasma seminal aumentou significativamente tanto a perda do capuz acrossomal ($37.5 \pm 1.6\%$ vs. $18.4 \pm 2.8\%$) quanto a expressão da proteína 15kDa tirosina fosforilada (marcadora de capacitação) em comparação ao grupo com plasma seminal e cachacos com boa congelabilidade. Além disso, a adição de 10% de plasma seminal aos espermatozoides descongelados suprimiu significativamente ambas mudanças e aumentou a taxa de concepção à inseminação artificial (70% vs. 9%) em comparação com o grupo sem adição de plasma seminal. Para Andrade et al. (2011) a adição de plasma seminal, independentemente de ser autólogo ou homólogo, levou ao aumento ($P < 0.05$) no número de células com membranas plasmática e acrossomal intactas e, em contraste, não alterou ($P > 0.05$) o número de células com potencial mitocondrial em equinos. Entretanto, Way e colegas (2000) concluíram que a exposição de espermatozoides do epidídimo de touros ao fluido das glândulas sexuais acessórias acelerava a morte celular e a reação acrossomal. Por esse efeito ter sido evidente na análise imediata, deduziram que componentes no fluido das glândulas sexuais acessórias tem efeito tóxico instantâneo sobre os espermatozoides. Assim como, o trabalho de Bergeron et al. (2004) mostrou que um contato contínuo dos espermatozoides com o plasma seminal contendo proteínas BSP's estimula também um efluxo contínuo de colesterol e fosfolipídios de colina podendo comprometer a habilidade do espermatozoide fertilizar um oócito, ainda

que, a exposição contínua dos espermatozoides ao plasma seminal não tenha estimulado reação acrossomal.

Corroborando com nossos achados, Koderle et al. (2009) trabalhando com espermatozoides caninos, não encontraram diferença significativa para taxa de fragmentação de cromatina antes da congelação, para o sêmen centrifugado e não centrifugado com a remoção do plasma seminal. Assim como, no sêmen não centrifugado não houve diferença na taxa de desnaturação de cromatina entre antes da congelação e após a descongelação. Entretanto, a centrifugação aumentou o grau de desnaturação da cromatina ao longo do tempo, o que não houve neste estudo. De acordo com o trabalho de Campanholi e colaboradores (2017), ambos os grupos nos quais o plasma seminal foi removido, exibiram maior porcentagem de células com membrana plasmática e acrossomal lesadas e, considerando que a membrana acrossomal possa ser mais resistente ao processo de congelação (CELEGHINI et al., 2008), essa diferença entre os tratamentos dá-se pela centrifugação. Acreditamos que a força de centrifugação utilizada no presente estudo (500 x g por 12 minutos) para a remoção do plasma seminal não foi forte o suficiente para lesionar as células espermáticas em nenhuma característica avaliada.

Os resultados encontrados no presente trabalho mostraram que houve aumento de perda de integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial ao decorrer do processo de criopreservação. Foi possível verificar que a etapa mais comprometedora para a integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial foi a congelação/dcongelação, concordando com os achados de Celeghini e colaboradores (2008), Nascimento et al. (2008), Papa et al. (2015) e Khalil et al. (2018).

Ao final do processo de congelação, os espermatozoides descongelados apresentaram 16,9% de integridade de membrana plasmática, estando em concordância com Arruda et al. (2005) que também encontraram tais resultados após a criopreservação de espermatozoides bovinos utilizando as mesmas técnicas para avaliação da membrana plasmática. Também obtivemos 50,6% de integridade de acrossomo e 26,1% de alto potencial mitocondrial, além de 42,7% (média de ambos os tratamentos) de remodelação dos filamentos de actina do citoesqueleto na região pós acrossomal dos espermatozoides, corroborando com os achados de Naresh et al. (2016) em búfalos, Correa et al., (2007) em macacos e Flores et al (2010) em cachacos. Notamos também, que a membrana acrossomal foi a melhor preservada após a

descongelamento, presumindo-se que a membrana acrossomal seja mais resistente ao processo de congelamento (CELEGHINI et al., 2008; KHALIL et al., 2018).

Foi possível observar que logo na primeira avaliação, aos $\pm 22^{\circ}\text{C}$, na qual o sêmen foi apenas diluído, já havia porcentagem de células íntegras (PIAIA) reduzida independente da remoção ou não do plasma seminal ($62,1 \pm 2,4$ para PS e $63,3 \pm 2,1$ para SPS), ou seja, os touros já ejacularam espermatozoides com lesões na membrana plasmática, acrossomo e potencial mitocondrial e remodelação de filamentos de actina do citoesqueleto ($17,5 \pm 1,0$ para PS e $20,4 \pm 1,1$ para SPS). Provavelmente, esses resultados são advindos de anomalias ao longo do transito epididimário, defeitos da espermatogênese ou estresse térmico. Nossos resultados divergem dos encontrados por Papa e colaboradores (2015) no qual, não obtiveram diferença significativa na porcentagem de células PIAIA do sêmen diluído ($73,7 \pm 2,6$) para o sêmen refrigerado ($76,5 \pm 2,2$).

Encontramos em nosso trabalho, aumento gradativo de remodelação de filamentos de actina do citoesqueleto quando observada etapa por etapa do processo de congelamento, sendo a congelamento/descongelamento mais prejudicial, o mesmo resultado foi encontrado em outro trabalho de nosso grupo, com equinos (CARVALHO et al. 2018), também em concordância com o proposto por Felipe-Pérez e colaboradores (2012) de que os elementos citoesqueléticos sejam termosensíveis e o resultado da refrigeração é a perda de proteínas do citoesqueleto. Nos parece que os espermatozoides se comportam à refrigeração de forma similar ao descrito por Hall et al. (1993), onde a refrigeração causou remodelação do citoesqueleto de células endoteliais, no qual, após o aquecimento, as células mesmo retornando ao normal aparentavam anormalidades no citoesqueleto, sugerindo que esse período de instabilidade tenha causado falhas mecânicas.

Quanto à etapa de congelamento, Naresh et al. (2016) reportou um declínio no conteúdo proteico de actina total e citoesqueleto danificado na membrana acrossomal podendo resultar na redução de qualidade dos espermatozoides de búfalos criopreservados, assim como Flores e colaboradores (2012) mostraram significativa degradação da actina nos espermatozoides congelados de cachacos, assim como em nossos achados. Entretanto, quando avaliamos o impacto de cada etapa do processo separadamente, percebemos que a etapa de refrigeração causou maior remodelação de F-actina (56,3%), diferentemente do esperado que seria a etapa de congelamento/descongelamento (23,9%).

Durante o período de equilíbrio houve uma redução de integridade de membrana acrossomal e potencial mitocondrial, bem como aumento da remodelação dos filamentos de actina do citoesqueleto (32,2%). Considerando que o período de equilíbrio tenha sido descrito como o momento destinado à diminuição do metabolismo espermático e início das interações com componentes do meio diluidor, diminuindo dessa forma, os riscos de choque térmico (WATSON, 1979), nossos achados contrapõem publicações reiterando os benefícios do mesmo em relação a integridade de membranas e função mitocondrial das células espermáticas devido a permissão de translocação da água, diminuindo os danos de formação de gelo durante a congelação e descongelação (DAHMI et al., 1993; LEITE et al., 2010; FLEISCH et al., 2017; MURPHY et al., 2018). O que nos leva a pensar que o período de equilíbrio escolhido, 1 hora a 5°C, tenha sido insuficiente para promover a diminuição do metabolismo espermático e interações com o diluidor para evitar os riscos de choque térmico.

Não encontramos neste estudo, diferença significativa de fragmentação de cromatina em nenhuma das etapas avaliadas. No trabalho de Papa et al. (2015), foi encontrado aumento de fragmentação da cromatina após a descongelação do sêmen. Assim como na publicação de Januskauskas et al. (2003), as mudanças na integridade de membrana foram atribuídas aos danos de DNA causados pela criopreservação. Esses autores encontraram correlação significativa positiva ($r = 0.33-0.51$, $P < 0.05$) entre a porcentagens de células com desnaturação de DNA e redução na integridade das membranas. Segundo Bochenek et al. (2001) lesões na estrutura da cromatina podem estar correlacionadas negativamente com a fertilidade do sêmen congelado bovino. Esses achados divergem dos resultados obtidos neste trabalho, nos quais, não tiveram influência de etapa, tampouco de tratamento sobre a fragmentação de cromatina avaliada. De qualquer modo, as porcentagens de alterações na cromatina encontradas são relativamente baixas, assim como os apresentados por Nongbua e colaboradores (2017) (1.8 ± 1.2 vs. 4.4 ± 5.0 ; centrifugado e não centrifugado, respectivamente), sendo assim, esses níveis de alterações não estariam associados a problemas na fertilidade, que como descrito por Evenson e Wixon (2006) para representar redução de fertilidade, a porcentagem de comprometimento da cromatina espermática deve estar entre 10 a 20%.

Podemos concluir que a presença ou ausência do plasma seminal tem pouca influência sobre as características de integridade de membranas, potencial mitocondrial e estrutura de cromatina durante o processo de congelação. Por outro lado, a presença do plasma seminal melhora a integridade acrossomal e previne a remodelação dos

filamentos de actina do citoesqueleto espermático. A etapa de refrigeração induz maior remodelação dos filamentos de actina do citoesqueleto. A congelação/descongelação é o momento mais prejudicial para as características espermáticas avaliadas. O período de equilíbrio causa efeito negativo sobre as características de membranas plasmática, acrossomal, potencial mitocondrial e remodelação dos filamentos de actina do citoesqueleto dos espermatozoides. A cromatina espermática não é afetada por nenhuma etapa do processo de congelação. As etapas pelas quais os espermatozoides são submetidos durante o processo de congelação geram lesões acumulativas, ou seja, os danos causados na descongelação são resultantes da somatória de injúrias causadas pela congelação, período de equilíbrio e refrigeração.

Ressaltamos a necessidade de mais estudos evidenciando o efeito do plasma seminal em cada etapa do processo de congelação e a importância da refrigeração na remodelação dos filamentos de actina do citoesqueleto.

Reconhecimento

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; VARGHESE, A.C.; SHARMA, R.K. Markers of oxidative stress and sperm chromatin integrity. In: Park-Sarge, O.K, Curry, T., editors. *Molecular Endocrinology. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, v. 590. Totowa, NJ: Humana Press (2009). p. 377–402.
- ANDRADE, A.F.C.; ZAFFALON, F.G.; CELEGHINI, E.C.C.; NASCIMENTO, J.; TARRAGÓ, O.F.B.; MARTINS, S.M.M.K.; ALONSO, M.A.; ARRUDA, R.P. Addition of seminal plasma to post-thawing equine semen: what is the effect on sperm cell viability? **Reproduction on Domestic Animals**, v. 46, p. 682-686, 2011.
- ARRUDA, R.P.; FORERO-GONZALEZ, R.A.; CELEGHINI, E.C.C.; RAPHAEL, C.F. Effects of cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotectants on plasmatic, acrosomal and mitochondrial membranes of bovine spermatozoa. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 329, 2005.
- ASSUMPÇÃO, T.I.; TORRES-JÚNIOR, R.A.A.; SOUZA, M.V.; RICART, C.A.O. Correlation between fertility and levels of protein, sugar and free amino acids in seminal plasma of Nelore bulls. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 55-61, 2005.
- BAILEY, J. L.; BILODEAU, J. F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 1–7, 2000.
- BAUST, J.G.; GAO, D.; BAUST, J.M. Cryopreservation: an emerging paradigm change. **Organogenesis**, v. 5, p. 90-96, 2009.
- BERGERON, A. **et al.** Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology Reproduction**, v. 70, p. 708-717, 2004.
- BOCHENEK, M.; SMORAG, Z.; PILCH, J. Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. **Theriogenology**, v. 56, p. 557-567, 2001.
- BREITBART, H.; COHEN, G.; RUBINSTEIN, S. Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. **Reproduction**, v. 129, n. 3, p. 263-268, 2005.

BRENER, E.; RUBINSTEIN, S.; COHEN, G.; SHTERNALL, K.; RIVLIN, J.; BREITBART, H. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. **Biology of Reproduction**, v.68, n.3, p.837-845, 2003.

BÜYÜKLEBLEBICI, S.; TUNCER, P.B.; BUCAK, M.N.; EKEN, A.; SARI ÖZKAN, S.; TAŞDEMİR, U.; ENDIRLIK, B.U. Cryopreservation of bull sperm: effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results. **Animal Reproduction Science**, v.150, p. 77–83, 2014.

CABELLO - AGÜEROS, J.F.; HERNÁNDEZ - GONZÁLEZ, E.O.; MÚJICA, A. The role of F - actin cytoskeleton-associated gelsolin in the guinea pig capacitation and acrosome reaction. **Cell motility and the cytoskeleton**, v. 56, n. 2, p. 94-108, 2003.

CAMPANHOLI, S.P. MONTEIRO, F.M.; DIAS, E.A.R.; MERCADANTE, M.E.Z.; CLAUDIA, C.P.P.; JUNIOR, J.A.D.; PAPA, F.O.; DELL'AQUA, C.P.F.; VANTINI, R.; GARCIA, J.M. Effect of seminal plasma removal before cryopreservation of bovine semen obtained by electroejaculation on semen quality and in vitro fertility. **Theriogenology**, v. 89, p. 114-121, 2017.

CARVALHO, C.P.T. **Avaliação do processo de congelação do sêmen equino in natura diluído, 5°C, -55°C e pós-descongelação.** 2018. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

CASTRO, L.S.; SIQUEIRA, A.F.P.; HAMILTON, T.R.S.; MENDES, C.M.; VISINTIN, J.A.; ASSUMPTIÇÃO, M.E.O.A. Sperm oxidative stress is detrimental to embryo development: a dose-dependent study model and a new and more sensitive oxidative status evaluation. **Oxidative medicine and Cellular Longevity**, p.12, 2016.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in domestic animals**, v. 42, n. 5, p. 479-488, 2007.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; RODRIGUES, P.H.M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 119-131, 2008.

CRESPILO, A.M.; PAPA, F.O.; SANTOS, M.P.; SÁ-FILHO, M.F. Use of cooled bull semen as a strategy to increase the pregnancy rate in fixed-time artificial insemination programs-case report. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v.7, n.4, p.175-179, 2012.

CORREA, L.M.; THOMAS, A.; MEYERS, S.A. The macaque sperm actin cytoskeleton reorganizes in response to osmotic stress and contributes to morphological defects and decreased motility. **Biology of reproduction**, v. 77, n. 6, p. 942-953, 2007.

DAHMI, A.J.; SAHNI, K.L. Evaluation of different cooling rates, equilibration periods and diluents for effects on deep-freezing, enzyme leakage and fertility of taurine bull spermatozoa. **Theriogenology**, v. 40, p. 1269-1280, 1993.

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

DIAS, E.A.R.; CAMPANHOLI, S.P.; ROSSI, G.F.; DELL'AQUA, C.P.F.; DELL'AQUA-JUNIOR, J.A.; PAPA, F.O.; ZORZETTO, M.F.; PAZ, C.C.P.; OLIVEIRA, L.Z.; MERCADANTE, M.E.Z.; MONTEIRO, F.M. Evaluation of cooling and freezing systems of bovine semen. **Animal Reproduction Science**, v.195, p. 102-111, 2018.

DILLER, K.R. Intracellular freezing: Effect of extracellular supercooling. **Cryobiology**, v. 12, n. 5, p. 480-485, 1975.

EVENSON, D.P.; WIXON, R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male fertility. **Theriogenology**, v. 65, p. 979-991, 2006.

EVENSON, D.P. The sperm chromatin structure assay (SCSA) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 169, p. 56-75, 2016.

FELIPE-PÉREZ, Y.E.; VALENCIA, J.; JUAREZ-MOSQUEDA, M.L.; PESCADOR, N.; ROA-ESPITIA, A.L.; HERNANDEZ-GONZALEZ, E.O. Cytoskeletal proteins F-actin and b-dystrobrevin are altered by the cryopreservation process in bull sperm. **Cryobiology**, v. 64, p. 103-109, 2012.

FLEISCH, A.; MALAMA, E.; WITSCHI, U.; LEIDING, C.; SIUDA, M.; JANETT, F.; BOLLWEIN, H. Effects of an extension of the equilibration period up to 96 hours on the characteristics of cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v. 89, p. 255-262, 2017.

FLORES, E.; FERNANDEZ-NOVELL, J.M.; PENAA, A.; RIGAU, T.; RODRIGUEZ-GILA, J.E. Cryopreservation-induced alterations in boar spermatozoa mitochondrial function are related to changes in the expression and location of mid-piece mitofusin-2 and actin network, **Theriogenology**, v. 74, p. 354-363, 2010.

GARCÍA, B.M.; MORAN, A.M.; FERNÁNDEZ, L.G.; FERRUSOLA, C.O.; RODRIGUEZ, A.M.; BOLLAÑOS, J.M.G.; SILVA, C.M.B.; MARTÍNEZ, H.R.; TAPIA, J.A.; PEÑA, F.J. The Mitochondria of stallion spermatozoa are more sensitive than the plasmalemma to osmotic-induced stress: Role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) Pathway. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 1, p. 105-113, 2012.

GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozoide e plasma seminal. In: Hafez, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7. Ed. Barueri: Manoele Ltda, c. 7, p. 97-110, 2004.

GRAHAM, J.K. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculates spermatozoal of the ram and the bull during the cryopreservation process. **Theriogenology**, v. 41, p. 1151-1162, 1994.

GRAVANCE, C.G.; VISHWANATH, R.; PITT, C.; GARNER, D.L.; CASEY, P.J. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. **Journal of Andrology**, v. 19, n. 6, p. 704-709, 1998.

GRÖTTER, L.G.; CATTANEO, L.; MARINI, P.E.; KJELLAND, M.E.; FERRÉ, L.B. Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thawed quality optimization. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, p. 655-665, 2019.

HALL, S.M.; EVANS, J.; HAWORTH, S.G. Influence of cold preservation on the cytoskeleton of cultured pulmonary arterial endothelial cells. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 9, p. 106-114, 1993.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUES-MARTINEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology**, v. 60, p. 743-758, 2003.

JONES, R.C.; STEWART, D.L. The effects of cooling to 5°C and freezing and thawing on the ultrastructure of bull spermatozoa. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 56, p. 233-238, 1979.

KHALIL, W.A.; EL-HARAIRY, M.A.; ZEIDAN, A.E.B.; HASSAN, M.A.E.; MOHEY-ELSAEED, O. Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation:

Structural and ultrastructural insights. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 6, p. s49-s56, 2018.

KORDELE, M.; AURICH, C.; SCHAFER- SOMI, S. The influence of cryopreservation and seminal plasma on the chromatin structure of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v. 72, p. 1215-1220, 2009.

LEITE, T.G.; VALE-FILHO, V.R.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; EMERICK, L.L.; ZAFFALON, F.G.; MARTINS, J.A.M.; ANDRADE, V.J. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, v. 120, p. 31-38, 2010.

LOVE, C.C.; BRISKO, S.P.; RIGBY, S.L.; THOMPSON, J.A.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. **Theriogenology**, v. 63, p. 1584-1591, 2005.

MANJUNATH, P.; THERIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, p. 109-119, 2002.

MARTINUS, R.D.; MOLAN, P.C.; SHANNON, P. Deleterious effect of seminal plasma in the cryopreservation of bovine spermatozoa. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 34, p. 281-285, 1991.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 247, n. 3, p. C125-C142, 1984.

MAXWELL, W.M.; WELCH, G.R.; JOHNSON, L.A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, p. 1165-1178, 1997.

MORRIS, G.J.; ACTON, E. Controlled ice nucleation in cryopreservation-a review. **Cryobiology**, v. 66, n. 2, p. 85-92, 2013.

MUIÑO, R.; FERNÁNDEZ, M.; PEÑA, A.I. Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 42, p. 305-311, 2007.

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

NAGY, S.; HALLAP, T.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, v. 80, p. 225–235, 2004.

NARESH, S. Effect of cooling (4° C) and cryopreservation on cytoskeleton actin and protein tyrosine phosphorylation in buffalo spermatozoa. **Cryobiology**, v. 72, n. 1, p. 7-13, 2016.

NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; ANDRADE, A.F.C.; ALONSO, M.A.; CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P. 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.

NONGBUA, T.; JOHANNISSON, A.; EDMAN, A.; MORRELL, J.M. Effects of single layer centrifugation (SLC) on bull spermatozoal prior to freezing on post-thaw semen characteristics. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 52, p. 596-602, 2017.

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

OZKAVUKCU, S., ERDEMLI, E. Cryopreservation: basic knowledge and biophysical effects. **Journal of Ankara medical school**, v. 24, n. 4, p. 187-196, 2002.

PAPA, P.M.; MAZIERO, R.D.; GUAISTI, P.N.; JUNQUEIRA, C.R.; DELL'AQUA, C.P.F.; PAPA, F.O.; VIANNA, F.P.; ALVARENGA, M.A.; CRESPILO, A.M.; DELL'AQUA-JUNIOR, J.A. Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen. **Theriogenology**, v. 83, p. 107-113, 2015.

PEDERSEN, S.F., HOFFMANN, E.K., MILLS, J.W. The cytoskeleton and cell volume regulation. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 130, p. 385-399, 2001.

PEÑA, F.J.; GARCÍA, B.M.; SAMPER, J.C.; APARICIO, I.M., TAPIA, J.A.,

FERRUSOLA, C.O. Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: The way to improve current cryopreservation protocols? **Theriogenology**, v. 76, p. 1177-1186, 2011.

PEÑA, F. J.; FERRUSOLA, C.O.; TAPIA, J.A.; APARICIO, I.M. How stallion sperm age in vitro? Scenario for preservation technologies. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 451–454, 2012.

PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 56, p. 425-434, 2001.

PERIS, S.I.; MORRIER, A.; DUFOUR, M.; BAILEY, J.L. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. **Journal of Andrology**, v. 25, p. 224–233, 2004.

SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W. F. Sperm membrane behavior during cooling and cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.50, n.S3, p.20-26, 2015.

SIQUEIRA, A.F.P.; CASTRO, L.S.; ASSIS, P.M.; BICUDO, L.C.; MENDES, C.M.; NICHI, M.; VISINTIN, J.A.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A. Sperm traits on in vitro production (IVP) of bovine embryos: too much of anything is good for nothing. **Plos One**, v.13, n.7, p.16, 2018.

SMALL, J.V.; ROTTNER, K.; HAHNE, P.; ANDERSON, K.I. Visualising the actin cytoskeleton. **Microscopy Research and Technique**, v. 47, n. 1, p. 3-17, 1999.

SUSILAWATI, T.; RAHAYU, S.; UDRAYANA, S.; SUDARWATI, H.; NUGROHO, E. Effect of diferente centrifugation duration on *Simmental* bull sperm quality and membrane status after sexing, cooling and freezing processes. **American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture**, v. 8, n. 7, p. 28-34, 2014.

UGUR, M.R.; ABDELRAHMAN, A.S.; EVANS, H.C.; GILMORE, A.A.; HITIT, M.; ARIFANTINI, R.I.; PURWANTARA, B.; KAYA, A.; MEMILI, E. Advances in cryopreservation of bull sperm. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, n. 268, p. 1-15, 2019.

WATERHOUSE, K.E.; GJELDNES, A.; TVERDAL, A.; ANGELIS, P.M.; FARSTAD, W.; HÅÅRD, M.; KOMMISRUUD, E. Alterations of sperm DNA integrity during cryopreservation procedure and in vitro incubation of bull semen. **Animal**

Reproduction Science, v. 117, p. 34-42, 2010.

WATSON, P. F. The preservation of semen in mammals. In: FINN, C. A. **Oxford reviews of reproductive biology**. New York: Oxford University Press., v. 1, p. 283-330, 1979.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, n. 4, p. 871-891, 1995.

WAY, A.L., GRIEL JR.; L.C., KILLIAN, G.J. Effects of accessory sex gland fluid on viability, capacitation, and the acrosome reaction of cauda epididimal bull spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 213-219, 2000.

Tabela 1. Médias (\pm erros padrão) das porcentagens de espermatozoides com integridade de membrana plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial, remodelação dos filamentos de actina (F-actina) do citoesqueleto e fragmentação de cromatina dos tratamentos com e sem plasma seminal (PS e SPS) em momentos do processo de congelação do sêmen bovino.

Características	22°C		5°C		5°C*		-196°C	
	PS	SPS	PS	SPS	PS	SPS	PS	SPS
MPI	64.5 \pm 2.2 ^a	66.0 \pm 2.0 ^a	45.9 \pm 2.4 ^b	48.5 \pm 2.3 ^b	46.6 \pm 2.3 ^b	45.3 \pm 2.3 ^b	17.2 \pm 1.1 ^c	16.6 \pm 1.5 ^c
AI	89.9 \pm 0.8 ^a	87.2 \pm 0.7 ^a	78.5 \pm 1.3 ^b	78.3 \pm 1.5 ^b	78.4 \pm 1.2 ^c	74.2 \pm 1.8 ^c	54.0 \pm 2.0 ^d	47.3 \pm 2.3 ^d
APM	69.3 \pm 2.5 ^a	70.1 \pm 2.4 ^a	54.1 \pm 2.7 ^b	56.1 \pm 2.5 ^b	50.4 \pm 2.6 ^c	52.0 \pm 2.6 ^c	25.8 \pm 2.4 ^d	26.5 \pm 2.6 ^d
PIAIA	62.1 \pm 2.4 ^a	63.3 \pm 2.1 ^a	42.9 \pm 2.5 ^b	46.0 \pm 2.2 ^b	43.8 \pm 2.3 ^b	42.0 \pm 2.3 ^b	15.0 \pm 1.1 ^c	14.6 \pm 1.5 ^c
F-actina	17.5 \pm 1.0 ^d	20.4 \pm 1.1 ^d	26.3 \pm 1.2 ^c	29.5 \pm 1.1 ^c	34.1 \pm 1.1 ^b	36.1 \pm 1.0 ^b	41.8 \pm 1.1 ^a	43.6 \pm 1.1 ^a
Cromatina	1.6 \pm 0.5 ^a	1.4 \pm 0.5 ^a	1.8 \pm 0.6 ^a	1.5 \pm 0.5 ^a	1.3 \pm 0.4 ^a	1.6 \pm 0.6 ^a	1.3 \pm 0.4 ^a	1.5 \pm 0.5 ^a

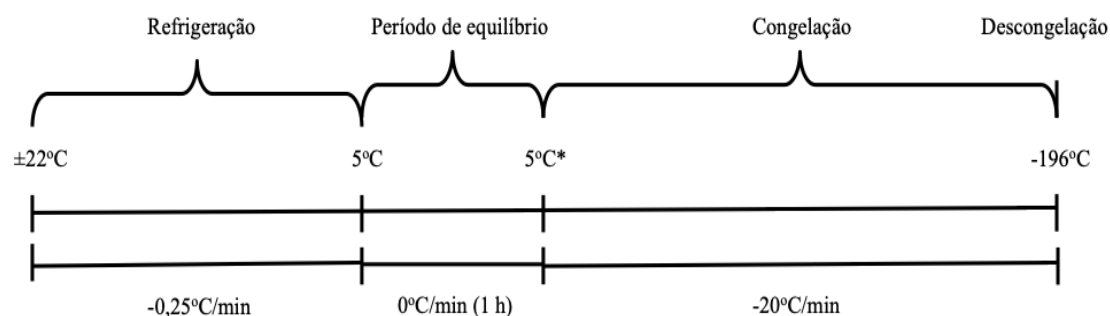
Letras diferentes (a,b,c,d) na mesma linha entre os tempos avaliados indicam diferenças estatísticas (P<0,05).

PIAIA= Célula com membrana plasmática intacta, acrossomo íntegro e alto potencial mitocondrial. MPI= membrana plasmática intacta. AI= acrossomo íntegro. APM= alto potencial mitocondrial. PS= com plasma seminal e SPS= sem plasma seminal.

22°C= temperatura ambiente; 5°C= temperatura na refrigeração; 5°C*= temperatura no período de equilíbrio por 1 hora; -196°C= equivalente a pós descongelação.

De 22°C a 5°C = etapa de refrigeração; de 5°C a 5°C* = período de equilíbrio; de 5°C* a -196°C = etapa de congelação/descongelação.

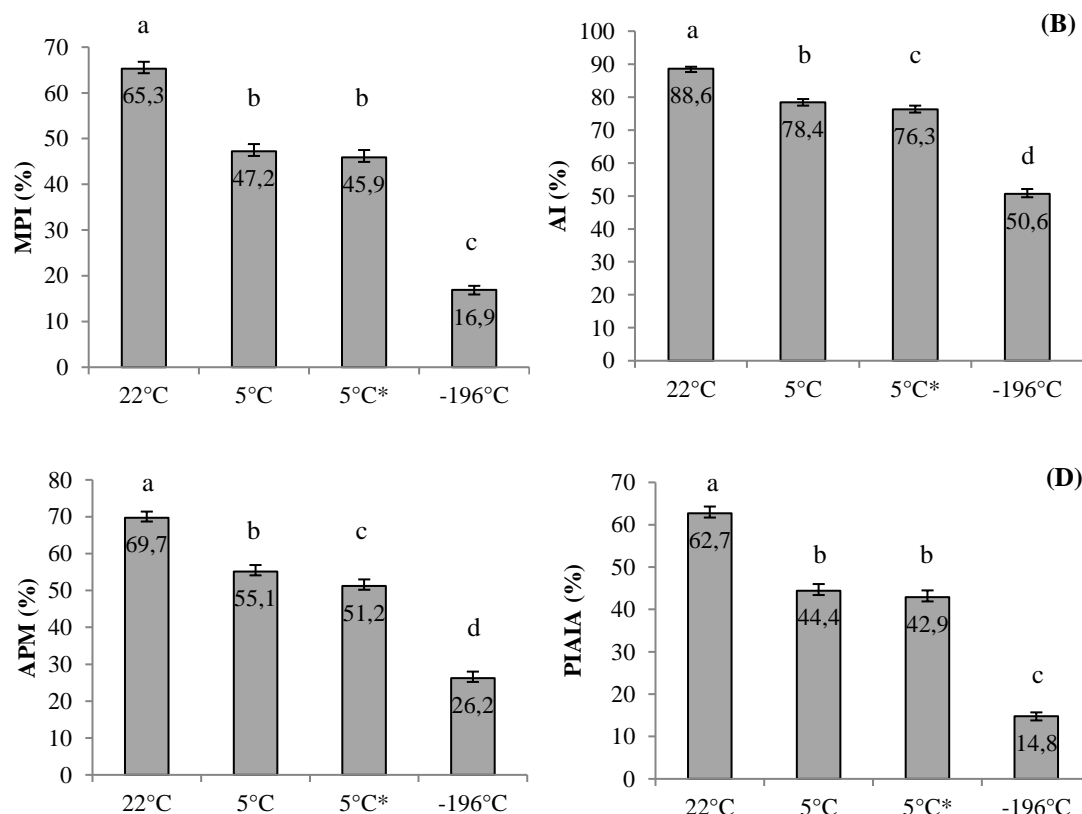
Figura 1. Esquemática das etapas avaliadas e curvas utilizadas (refrigeração, período de equilíbrio e congelamento) durante o processo de congelamento do sêmen bovino.



Etapas de refrigeração: de $\pm 22^{\circ}\text{C}$ a 5°C ; Período de equilíbrio: 5°C^* por 1 hora; Congelamento/descongelamento: de 5°C^* a -196°C .

$-0,25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ = curva de refrigeração até 5°C ; $0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ = velocidade no período de equilíbrio; $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ = velocidade da curva de congelamento até -196°C .

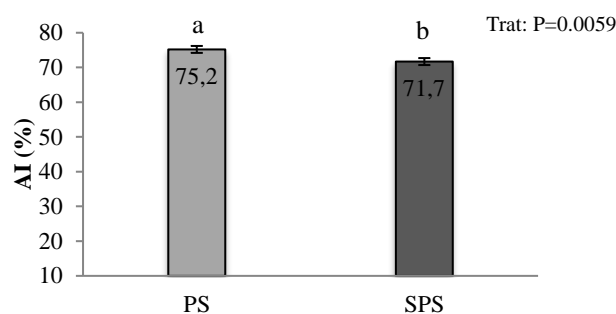
Figura 2. Médias (\pm erros padrão) das porcentagens de espermatozoides com integridade de membrana plasmática (MPI), acrossomo íntegro (AI) e alto potencial mitocondrial (AMP) e integridade de membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial (PIAIA) em momentos do processo de congelamento do sêmen bovino.



Letras diferentes (a,b,c,d) indicam diferenças estatísticas entre os tempos do processo de congelamento ($P < 0,05$).

22°C = temperatura ambiente; 5°C = temperatura na refrigeração; 5°C^* = temperatura do período de equilíbrio por 1 hora; -196°C = equivalente a pós descongelamento.

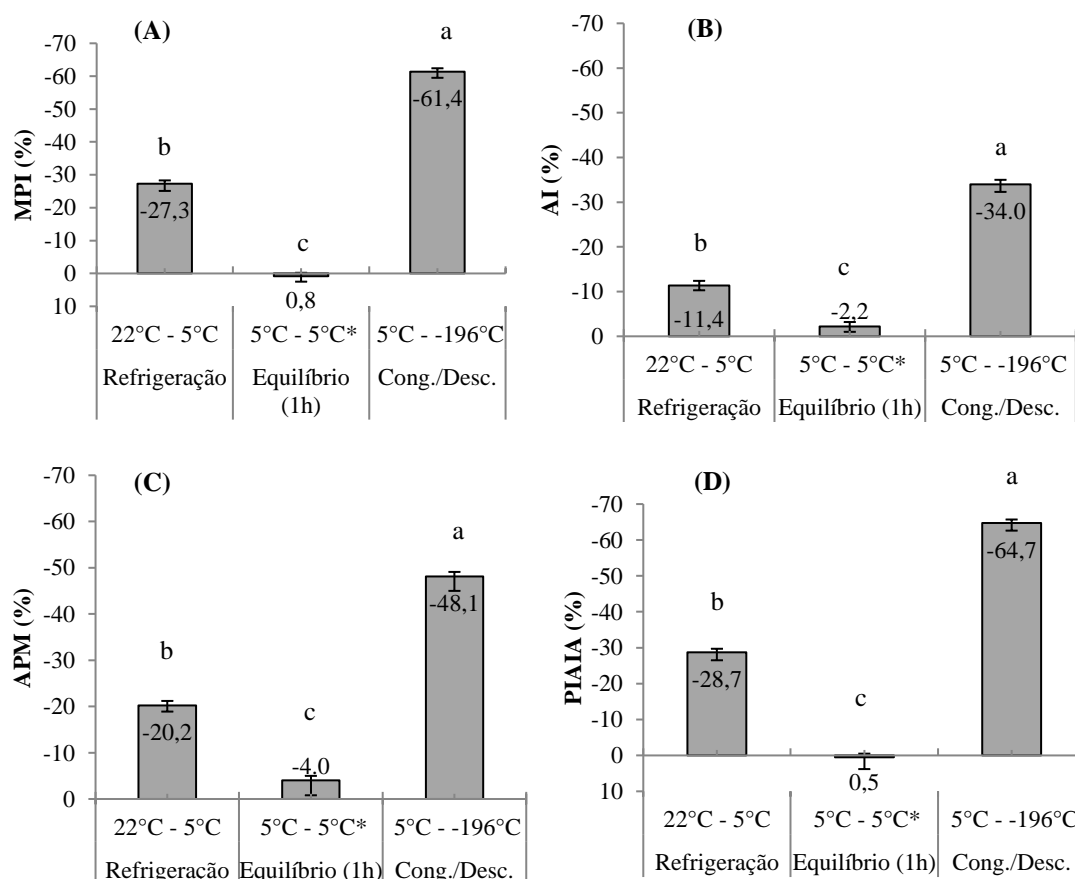
Figura 3. Médias (\pm erros padrão) das porcentagens de espermatozoides com integridade de acrosomo (AI%) dos tratamentos com e sem plasma seminal (PS e SPS) em sêmen bovino congelado.



Letras diferentes (a,b,c,d) indicam diferença estatística entre as médias gerais dos tratamentos ($P < 0,05$).

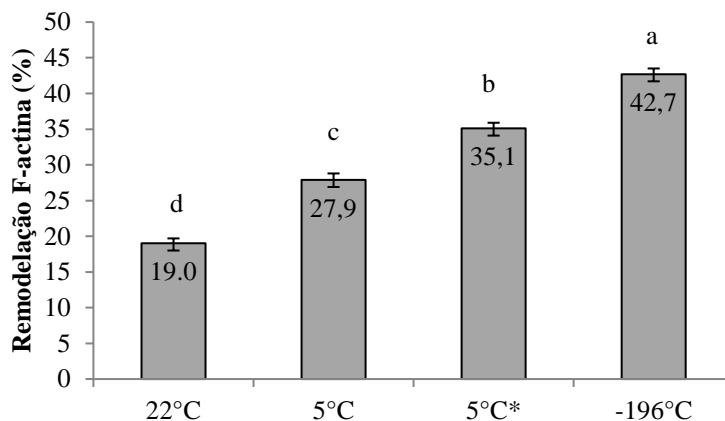
PS= com plasma seminal e SPS= sem plasma seminal.

Figura 4. Médias (\pm erros padrão) da redução das porcentagens de espermatozoides com integridade de membranas plasmática (MPI), acrossomal (AI), potencial mitocondrial (APM) e integridade de membrana plasmática, acrossomal e alto potencial mitocondrial (PIAIA) em momentos do processo de congelamento do sêmen bovino.



Letras diferentes (a,b,c) indicam diferenças estatísticas entre os tempos da curva de congelamento ($P < 0,05$).

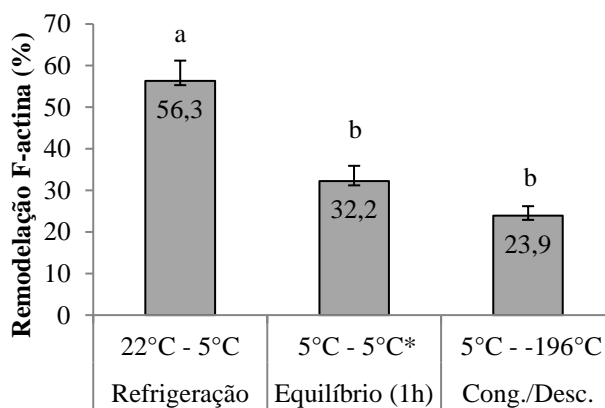
Figura 5. Médias (\pm erros padrão) das porcentagens de espermatozoides com remodelação dos filamentos de actina (F-actina) do citoesqueleto em momentos do processo de congelação de sêmen bovino.



Letras diferentes (a,b,c,d) indicam diferenças estatísticas entre os tempos do processo de congelação ($P < 0,05$).

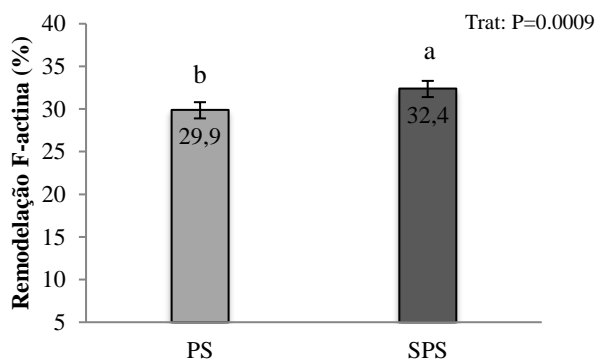
22°C= temperatura ambiente; 5°C= temperatura na refrigeração; 5°C*= temperatura do período de equilíbrio por 1 hora; -196°C= equivalente a pós descongelação.

Figura 6. Médias (\pm erros padrão) da redução das porcentagens de espermatozoides com remodelação dos filamentos de actina (F-actina) do citoesqueleto em momentos do processo de congelação do sêmen bovino.



Letras diferentes (a,b,c) indicam diferenças estatísticas entre os tempos do processo de congelação ($P < 0,05$).

Figura 7. Médias (\pm erros padrão) das porcentagens de espermatozoides com remodelação dos filamentos de actina (F-actina) do citoesqueleto dos tratamentos com e sem plasma seminal (PS e SPS) no sêmen bovino congelado.



Letras diferentes (a,b,c,d) indicam diferença estatística entre as médias gerais dos tratamentos ($P < 0,05$).

PS= com plasma seminal e SPS= sem plasma seminal durante o processo de congelamento do sêmen bovino.