



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

DAIANNY BARBOZA GUIMARÃES

**PROTEÍNAS DA MEMBRANA PLASMÁTICA DO
ESPERMATOZOIDE SUÍNO E SUA RELAÇÃO COM A RESISTÊNCIA
AO PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO**

**FORTALEZA
2013**

DAIANNY BARBOZA GUIMARÃES

PROTEÍNAS DA MEMBRANA PLASMÁTICA DO ESPERMATOZOIDE
SUÍNO E SUA RELAÇÃO COM A RESISTÊNCIA AO PROCESSO DE
CRIOPRESERVAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e sanidade carnívoros, onívoros, herbívoros e aves

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Toniolli

FORTALEZA
2013

C963p Guimarães,Daianny Barboza.

Proteínas da membrana plasmática do espermatozoide suíno e sua relação com a resistência ao processo de criopreservação/Daianny Barboza Guimarães.— 2013.

CD-ROM 95f. : il. (algumas color.) ; 4 ¾ pol.

“CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico, acondicionado em caixa de DVD Slin (19 x 14 cm x 7 mm)”.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2013.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Orientação: Prof. Dr. Ricardo Toniolli.

1. Criopreservação. 2. Proteômica. 3. Sêmen suíno. I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

CDD: 633

DAIANNY BARBOZA GUIMARÃES

PROTEÍNAS DA MEMBRANA PLASMÁTICA DO ESPERMATOZOIDE
SUÍNO E SUA RELAÇÃO COM A RESISTÊNCIA AO PROCESSO DE
CRIOPRESERVAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da
Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Toniolli

Aprovada em: 10/12/2013

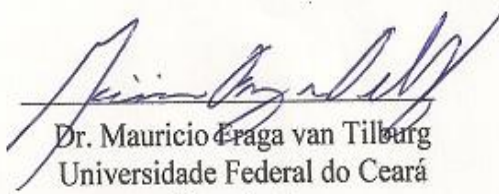
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Ricardo Toniolli
FAVET / Universidade Estadual do Ceará
Orientador



Prof.ª Dr.ª. Carmina Sandra Brito
Salmito-Vanderley
Universidade Estadual do Ceará
Examinadora



Dr. Mauricio Praga van Tilburg
Universidade Federal do Ceará
Examinador

À Deus, em primeiro lugar pelo dom da vida, e à minha mãe, pelo exemplo de força e dedicação, onde se fez presente em toda a minha caminhada, me apoiando para superar todas as dificuldades que ocorreram durante mais uma conquista.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder o dom da vida.

À Universidade Estadual do Ceará, a todos os professores do Programa de Pós Graduação e a todos os servidores Técnico-administrativo pelo conhecimento adquirido neste curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, Maria Cecília Guimarães e Francisco Teodoro Guimarães, por todos esses anos de amor e dedicação. Foram os principais responsáveis por me fazerem chegar até aqui e é a Eles que dedico essa vitória.

Aos meus irmãos, Daniel Barboza Guimarães e Danielly Barboza Guimarães, verdadeiros exemplos no qual eu busco me espelhar.

Ao Professor Dr. Ricardo Toniolli, por ter caminhado lado à lado neste momento tão importante da minha vida, me aconselhando e se dedicando como um pai para mim.

Ao Professor Dr. Arlindo Moura por abrir as portas do seu laboratório de Fisiologia Animal, para que o experimento pudesse ser executado, e pelas adoráveis conversas sempre tão divertidas.

Ao Dr. Maurício Fraga van Tilburg, Dr. Jorge André Matias Martins e Verónica González Cadavid que me acolheram no laboratório de Fisiologia Animal e se disponibilizaram a me ensinar o protocolo de proteômica.

À granja Xerez, em especial ao médico veterinário Carlos e ao técnico Marciano, por terem cedido o sêmen de alguns animais para a realização do trabalho.

Ao Jocemar, responsável pela coleta e higienização dos animais do Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia do Sêmen (LRSTS), onde sua participação foi fundamental para que o trabalho pudesse ser desenvolvido.

À Tatyane Bandeira Barros, uma grande amiga que esteve presente em todas as etapas do meu experimento e me apoiou nos momentos de maiores dificuldades.

À toda a equipe, por que não dizer família, do LRSTS, em especial as mestrandas Aline Viana Dias e Ludymila Furtado Cantanhêde, aos IC's Jonseli, Thallys, Eduardo e Iury e à técnica do laboratório Rocilda, que proporcionaram um local de imenso prazer, cheio de alegria e companheirismo.

As minhas amigas de infância, Bruna Mayara, Isadora Ribeiro, Ivanna Vale, Laryssa Regina e Rochelle Gadelha, por me proporcionarem apoio e alegria em todos os momentos da minha vida.

À minha turma de mestrado, por um dia termos acreditado em nosso sonho e poder ter compartilhado com vocês essa jornada, onde vocês permitiram tudo ficar mais divertido.

À todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Meu muitíssimo obrigada!

RESUMO

O uso do sêmen congelado está associada a baixos índices produtivos. Por isso, estudos têm sido realizados com a finalidade de identificar novos diluentes e proteínas presentes no sêmen que possibilitem a busca por marcadores de congelabilidade. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo testar a água de coco em pó como diluente alternativo e identificar as proteínas da membrana plasmática do espermatozoide que estejam relacionadas com a proteção do espermática durante o processo de criopreservação. Para tanto, o sêmen de quinze reprodutores foi coletado uma vez por semana e foi retirado um total $2,5 \times 10^9$ spz/ejaculado para o protocolo de congelação e 10×10^9 spz/ejaculado para o protocolo de proteômica. Para a criopreservação, o sêmen foi diluído em Beltsville Thawing Solution (BTS - Controle) e Água de Coco em Pó (ACP-103®). Os ejaculados foram submetidos a uma curva de resfriamento lenta, onde foram feitas análises de vigor e motilidade em cada passo. O sêmen descongelado foi resuspendido em seus respectivos diluentes e analisado quanto ao vigor, motilidade, vitalidade, integridade acrossomal e funcionabilidade da membrana. Para o estudo das proteínas da membrana dos espermatozoides, estes foram submetidos à eletroforese bidimensional. Os géis foram corados com Coomassie coloidal, digitalizados e analisados por meio do aplicativo PDQuest. Para a busca por marcadores de congelabilidade, foi feita uma divisão dos animais em dois grupos: congelabilidade boa (GFEs) e ruim (PFEs), através dos resultados de vigor e motilidade após a descongelação. Isto possibilitou comparar as proteínas presentes em cada grupo e correlacioná-las com a criopreservação do sêmen. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso. A análise estatística foi processada através da avaliação das médias e desvios padrões, aos quais foram aplicados os testes de Mann-Witney e o teste t de Student. Para comparação de múltiplas médias foi utilizado o teste ANOVA com pós-teste de TUKEY. Todos os testes foram realizados com um índice de significância de 0,05. Quanto ao protocolo de congelação, observou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$) durante as análises de vigor e motilidade que compõem a curva de resfriamento, e na descongelação, para as análises de vitalidade e membrana acrossomal intacta. Já após a descongelação, o BTS apresentou melhores resultados de vigor espermático, motilidade espermática e funcionabilidade da membrana ($p < 0,05$). Embora os diluentes não tenham apresentando resultados semelhantes, os resultados obtidos com o diluente ACP estão dentro dos parâmetros aceitáveis para sêmen suíno. Os quatorze animais foram separados em dois grupos, onde seis animais foram considerados com boa congelabilidade (GFEs) e apresentaram uma média para vigor e motilidade espermática de $2,2 \pm 0,8$ e $41,8 \pm 22,9$, respectivamente, enquanto que o grupo de congelabilidade ruim (PFEs) foi composto por oito animais que apresentaram uma média de $1,9 \pm 0,6$ de vigor e $26,8 \pm 17,5$ de motilidade espermática. Foi encontrado uma média de $263 \pm 62,2$ spots por gel e um total de $234,2 \pm 54,6$ spots foi detectado de forma consistente nos géis dos quatorze animais. Foram encontrados 5 spots que divergiram significativamente entre os grupos, onde 3 foram encontrados com maior intensidade no grupo PFES e 2 spots foram mais expressos no GFEs. Quanto a curva de resfriamento e a água de coco em pó, estas podem ser utilizadas no protocolo de criopreservação do sêmen suíno, visto que ambas asseguraram qualidade da viabilidade espermática que possa vir a ser utilizada na inseminação artificial e, quanto ao estudo da composição proteica da membrana espermática, os cinco spots detectados podem atuar como possíveis marcadores de congelabilidade para o sêmen suíno.

Palavras-chave: Criopreservação; Proteômica; Sêmen suíno.

ABSTRACT

The use of frozen semen is associated with low production rates. Hence, studies have been conducted with the aim of identifying new solvents and proteins present in the semen to enable the search for freezability markers. Thus, this study aimed to test the coconut powder as an alternative diluent and identify the proteins of the plasma membrane of the sperm that are related to the protection of sperm during cryopreservation. Therefore, the semen from fifteen boars was collected once a week and a total 2.5×10^9 sperm/ejaculate for freezing protocol and 10×10^9 sperm/ejaculate for proteomics protocol were withdrawn. For cryopreservation, the semen was diluted in Beltsville Thawing Solution (BTS - Control) and Coconut Water Powder (ACP -103 ®). The samples were subjected to a slow cooling curve, in which were analyzed in force and motility in each step. The thawed semen was resuspended in their respective solvents and analyzed for force, motility, vitality, acrosome integrity and membrane functionality. For the study of sperm membrane proteins, they were subjected to two-dimensional electrophoresis. Gels were stained with colloidal Coomassie, scanned and analyzed using PDQuest application. To search for freezability markers, was made a division of the animals into two groups: good freezability (GFEs) and bad freezability (PFEs), through the results of vigor and motility after thawing . This made possible the comparison of the proteins present in each group and correlation between them and semen cryopreservation. The experimental lineation was in randomized blocks. The statistical analysis was made by evaluating the means and standard deviations, in which were applied the Mann -Whitney and Student t test. For comparison of multiple means the ANOVA test with TUKEY post-test was used. All tests were performed with a significance level of 0.05. As for the freezing protocol, it was observed that there was no significant difference between treatments ($p > 0.05$) during the analysis of vigor and motility that make up the cooling curve, and thawing for analysis of vitality and intact acrosomal membrane. In contrast, after thawing, the BTS showed better results in sperm vigor, sperm motility and membrane functionality ($p < 0,05$). Although solvents have not presenting similar results, the results obtained with the ACP diluent are within acceptable parameters for pig semen. The fourteen animals were separated into two groups, where six animals were considered with good freezability (GFEs) and had an average sperm motility and vigor of 2.2 ± 0.8 and 41.8 ± 22.9 , respectively, while the group with bad freezability (PFEs) consisted of eight animals with a mean of 1.9 ± 0.6 to 26.8 ± 17.5 vigor and sperm motility . An average of 263 ± 62.2 spots per gel was found and a total of 234.2 ± 54.6 spots was consistently detected in the gels of the fourteen animals. Five spots that differed significantly between groups were found, where 3 were found in the group with greater intensity PFES and 2 spots were more expressed in GFEs. About the cooling curve and coconut water powder, they can be used in the protocol for cryopreservation of boar semen, as both ensured quality of sperm viability that may be used in artificial insemination and, in the study of protein composition of the membrane sperm, the five spots detected can act as potential markers for boar semen freezability.

Keywords: Cryopreservation; proteomics, boar semen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Gel Bidimensional de proteínas de membrana de espermatozoides suínos. Amostras focalizadas em tiras de 13 cm com pI de 4 – 7. SDS-PAGE (12,5%). 400 ug de proteínas por Gel. As proteínas foram coradas com Coomassie blue coloidal..... 80

Figura 2 - Intensidades (médias e erros-padrão) dos spots 1, 2 e 3 no mapa bidimensional da membrana dos espermatozoides de suínos, agrupados de acordo com os resultados de vigor e motilidade espermática analisados após a descongelação seminal, dividindo-os em PFEs e GFEs. Letras distintas diferem pelo teste de t de Student ($CV > 30\%$)..... 81

Figura 3 - Intensidades (médias e erros-padrão) dos spots 4 e 5 no mapa bidimensional da membrana dos espermatozoides de suínos, agrupados de acordo com os resultados de vigor e motilidade espermática analisados após a descongelação seminal, dividindo-os em PFEs e GFEs. Letras distintas diferem pelo teste de t de Student ($CV > 30\%$)..... 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise comparativa do vigor espermático durante o resfriamento, no sêmen suíno conservado nos diluentes BTS e ACP-103®, visando a congelação.....	57
Tabela 2 - Análise comparativa da motilidade espermática (%) durante o resfriamento, no sêmen suíno conservado nos diluentes BTS e ACP-103®, visando a congelação.....	59
Tabela 3 - Análises de vigor e motilidade espermática do sêmen suíno analisados após a descongelação.....	62
Tabela 4 - Total de espermatozoides vivos (%), com acrossoma intacto e vivos com acrossoma intacto do sêmen suíno analisado no pós-descongelação.....	63
Tabela 5 - Total de espermatozoides reativos ao teste de resistência osmótica (%) do sêmen suíno analisado após descongelação.....	65

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Curva de resfriamento com suas respectivas análises de vigor e motilidade na congelação e descongelação do sêmen suíno.....	54
Gráfico 2 - Análise da variação do vigor espermático, durante a curva de resfriamento do sêmen suíno, conservado no diluente BTS e ACP-103®.....	58
Gráfico 3 - Análise da variação da motilidade espermática, durante a curva de resfriamento do sêmen suíno, conservado no diluente BTS e ACP-103®.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACRBP - Acrosin Binding Protein

ACP-103[®] - Água de Coco em Pó

ATP - Trifosfato de Adenosina

BTS - Beltsville Thawing Solution

°C – graus Celsius

cm - Centímetro

CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal

DIC - Contraste Interferencial

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DTT – Ditioneitol

g - gramas

G - Gravidade

GFEs - Good Freezability Ejaculates

IA - Inseminação Artificial

IEF - Focalização Isoelétrica

kDa – Quilo Dalton

Min - Minutos

mL – MiliLitro

μL - Microlitro

pH - Potencial de Hidrogênio

pI - Ponto Isoelétrico

PFEs - Poor Freezability Ejaculates

PMSF - Phenylmethanesulfonyl fluoride

ppm - Partes por Milhão

PVC - Polivinílico em Pó

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

TPI - Triose-phosphate Isomerase

TRO - Teste de Resistência Osmótica

v - Volume

V – Volts

Vh – Volts x Hora

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Características do ejaculado suíno	18
2.1.1 Composição do sêmen:.....	18
2.2 Avaliação seminal	19
2.2.1 Motilidade espermática	19
2.2.2 Vigor espermático	20
2.2.3 Morfologia espermática.....	20
2.2.4 Funcionalidade da membrana (estresse térmico e osmótico).....	20
2.3 Diluentes de sêmen.....	21
2.3.1 Diluente água de coco	22
2.4 Conservação do sêmen	23
2.4.1 Uso da refrigeração do sêmen	23
2.4.2 Uso da criopreservação do sêmen	23
2.5 Proteômica do sêmen	25
2.5.1 Proteínas da membrana plasmática do espermatozoide	26
3 JUSTIFICATIVA.....	27
4 HIPÓTESE CIENTÍFICA	29
5 OBJETIVOS.....	30
5.1 Objetivo Geral	30
5.2 Objetivos Específicos.....	30
6 CAPÍTULO I - Aspectos morfofisiológicos dos espermatozoides.....	31
7 CAPÍTULO II - Sperm quality during the cooling curve and use of ACP-103® diluent on cryopreservation of boar semen.....	48
8 CAPÍTULO III - Associação de proteínas espermáticas com a qualidade da criopreservação do sêmen suíno.....	72
9 CONCLUSÃO	86

10 PERSPECTIVAS	87
11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, estima-se que sejam realizadas em torno de 19 milhões de inseminações artificiais (IA) com sêmen suíno no mundo, sendo que destas, menos de 1% envolvem o uso de sêmen criopreservado (JOHNSON; WEITZE; FISER, 2000). A utilização extensiva da IA baseia-se na técnica da conservação do sêmen resfriado, a qual, apesar de proporcionar resultados de fertilidade semelhantes ou até melhores quando comparado com a monta natural, apresenta uma limitação quanto a sua utilização em um período de 2 a 3 dias após a coleta (SCHEID et al., 1986).

Esta limitação poderia ser facilmente superada com o emprego de sêmen congelado, que vem sendo estudado desde o início da década de 60, com o intuito de otimizar os protocolos de congelação na espécie suína (HESS; LUDWICK; TEAGUE, 1960). No entanto, o uso de sêmen criopreservado ainda está associado a índices reprodutivos insatisfatórios, quando comparados aos obtidos com o emprego de sêmen resfriado (WOELDEERS, 1997).

Estes resultados insatisfatórios estão relacionados com o fato do espermatozoide suíno ser bastante sensível a baixa temperatura, mas a resistência das células espermáticas parecem ser mais dependentes das características do animal do que do processo de criopreservação em si (MEDRANO; HOLT; WATSON, 2009). Pois, nem todos os animais apresentam resultados ruins para a criopreservação, o que permite classificá-los como sêmen bom ou ruim para a congelação (CASAS et al., 2009).

Uma particularidade da criopreservação é que cada animal tende a apresentar resultados semelhantes após a congelação seminal quando comparado com seus resultados anteriores, ou seja, aquele animal que apresentou uma boa congelabilidade, tende a apresentar sempre bons resultados, levando então a considerar sua origem genética como um fator dependente para a proteção espermática após a criopreservação (THURSTON et al., 2002).

Essas características particulares que faz com que cada animal apresente o mesmo resultado para a criopreservação, ainda não foram determinadas. Estudos vem sendo realizados com o intuito de aumentar o conhecimento a respeito da base molecular do sêmen, identificando as proteínas e a intensidade com que estas estão expressas nos animais (MOURA et al., 2006) e correlacioná-las com a proteção espermática após a criopreservação.

O estudo do proteoma permite obter informação sobre os perfis de expressão das proteínas referentes à sua abundância e localização. Na espécie humana, estudos da proteômica têm sido realizados para diagnosticar pacientes com problemas ligados à fertilidade e pacientes vasectomizados (STARITA-GERIBALDI et al., 2001), como também marcadores de azoospermia (YAMAKAWA et al., 2007).

Na produção animal pode-se observar um interesse crescente na utilização da proteômica. A aplicabilidade da proteoma está relacionada ao estudo do sistema imunitário de espécies aviárias (BURGESS, 2004), à parasitologia (DE VENEVELLES et al., 2004), à reprodução (STRZEZEK et al., 2005) e à nutrição (FUCHS et al., 2005).

A identificação dos grupos proteicos presentes no ejaculado pode dar suporte a diversas linhas de pesquisas, tais como: criopreservação de gametas, busca de marcadores de congelabilidade e melhoramento de técnicas de fertilização *in vitro*, através da caracterização de proteínas específicas envolvidas na atividade espermática (COLLARES, 2005).

Desta forma, a caracterização de proteínas presentes no sêmen de diferentes espécies, com a identificação de alguns desses polipeptídeos, vêm sendo utilizada como marcador seletivo de fertilidade e de congelabilidade do sêmen (JOBIM; OBERST; SALBEGO, 2004; MOURA; CHAPMAN; KOC, 2006). Assim, o presente trabalho teve como objetivo identificar a possível associação de proteínas presentes na membrana plasmática do espermatozoide suíno com a proteção espermática após o processo de criopreservação do sêmen.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características do ejaculado suíno

Dentre as espécies de animais domésticos, o suíno é o que apresenta o maior volume do ejaculado, chegando até a fornecer 500 mL em uma só coleta. Esta característica, no entanto, pode ser influenciada pela idade do animal, pelo intervalo entre coletas, pelo estado nutricional e pela raça (CAVALCANTI, 1998).

O ejaculado pode ser dividido em quatro fases distintas, sendo elas a uretral, a rica, a pobre e a gelatinosa. A fase das glândulas uretrais consiste nos primeiros 10 a 15 mL liberados e tem a função de adequar o canal da uretra para a passagem dos espermatozoides, desta forma, essa primeira parte não é aproveitada no momento da coleta. Já a fase rica, onde seu aspecto varia de leitoso à leitoso denso, contém cerca de 70% dos espermatozoides do ejaculado. A fase pobre, que apresenta um aspecto soroso, contém o restante dos espermatozoides do ejaculado. Essas duas fases do ejaculado são aproveitadas para a análise e posterior conservação do sêmen. Por último, a fase gelatinosa, que é composta pela secreção das glândulas bulbo-uretrais, fica retida através do uso de um papel filtro ou gaze no copo de coleta, sendo posteriormente descartada (BORTOLOZZO et al., 2005).

2.1.1 Composição do sêmen:

O sêmen é um líquido ou suspensão celular semigelatinosa contendo espermatozoides e plasma seminal, que é um fluido extracelular, composto de secreções das glândulas anexas do aparelho reprodutor masculino e que atua como veículo para transporte da célula espermática (MILLER et al., 1990). Além disso, funciona como um meio rico em nutrientes que favorece a sobrevivência dos espermatozoides no genital feminino. O plasma seminal é um fluido muito complexo, caracterizado por grande conteúdo de água, íons inorgânicos, ácido cítrico, açúcares, sais orgânicos, prostaglandinas e um número variado de proteínas que agem como substâncias tampão, de forma a manter a osmolaridade adequada e um pH próximo de sete (7,0). Ele fornece substratos metabolizáveis que servem como fonte de energia para o metabolismo tanto aeróbico quanto anaeróbico (MANN; LUTWAK-MANN, 1981).

O plasma possui também substâncias enzimáticas e não-enzimáticas que servem como mecanismo de defesa contra as espécies reativas de oxigênio. Além dessas enzimas, ele contém outros componentes que agem como antioxidantes, dentre eles a vitamina E, vitamina C, urato e a albumina (ALMEIDA; BALL, 2005). Dentre as diferentes substâncias as quais compõem o plasma seminal, as proteínas são os constituintes orgânicos encontrados em maior

quantidade. Essas proteínas são importantes fisiologicamente para o sêmen e estão presentes na forma de complexos associados, com composição, conformação e tamanho específico para cada espécie animal (JELÍNKOVÁ et al., 2003).

2.2 Avaliação seminal

Na espécie suína, Colenbrander et al. (1993) sugerem que as características a serem avaliadas e os requerimentos mínimos de um ejaculado necessários para sua aplicação pela técnica de IA são: motilidade espermática ($\geq 60-70\%$); morfologia espermática ($\leq 20\%$ de células anormais totais); total de células (48×10^9 sptz / ejaculado). Evidentemente, estes valores podem sofrer variações em decorrência da idade do animal e quanto à frequência das coletas de sêmen que o animal é submetido. De qualquer forma, estipula-se um valor $\geq 60\%$ de gametas móveis após 48 horas de armazenamento do sêmen. Segundo o CBRA (1998), os valores médios normais para as características volume, motilidade espermática, vigor espermático e concentração espermática são, respectivamente, 200-300mL, 80%, 3,0 e 200-400 ($\times 10^6/\text{mL}$).

O objetivo da avaliação seminal é conhecer o número de células estrutural e funcionalmente normais, relacionando-as com a capacidade fecundante do sêmen (PEÑA, 1997). Entretanto, nenhum teste, isoladamente, é capaz de prever a fertilidade de um ejaculado, sendo necessário então a combinação de vários testes com a finalidade de se poder selecionar e utilizar um ejaculado, visando potencialmente melhores resultados de fertilidade (HAFEZ; HAFEZ, 2003). Segundo Bortolozzo et al. (2005), a avaliação do sêmen é empregada para identificar possíveis causas de infertilidade no rebanho ou para detectar a tempo alterações que possam comprometer a capacidade fecundante do espermatozoide.

2.2.1 Motilidade espermática

Segundo o CBRA (1998), a motilidade espermática é expressa em porcentagem conforme a proporção de espermatozoides que apresentam algum tipo de movimentação, ou seja, é o total de células que estejam móveis. Ela é também uma avaliação subjetiva, podendo estar sujeita à variação na dependência do treinamento do técnico. A motilidade é um atributo importante para o deslocamento espermático no trato reprodutivo e para a penetração no oócito. Ela é um exame simples, rápido, de baixo custo, sendo de qualquer forma um bom indicador da integridade e funcionalidade das membranas (GADEA, 2005), e apesar de sua avaliação subjetiva, constitui-se do principal parâmetro utilizado para selecionar os ejaculados.

2.2.2 Vigor espermático

O vigor representa a força do movimento dos espermatozoides, o qual influencia a velocidade com que estes se deslocam (CORRÊA et al., 2001). Segundo Bortolozzo et al. (2005), este parâmetro avalia a qualidade do movimento espermático e é estabelecido com base em um escore de 0 a 5, onde é levado em consideração o tipo e a direção do movimento. Quanto ao valor zero, indica ausência de movimento dos espermatozoides e o valor 5 indica um movimento vigoroso e progressivo dos mesmos (CORRÊA et al., 2001).

2.2.3 Morfologia espermática

O exame de morfologia espermática tem como objetivo a avaliação dos espermatozoides através do percentual de alterações morfológicas. Células anormais podem ser indicativo de alterações na espermatogênese, na maturação espermática ou de uma inadequada manipulação do ejaculado (BORTOLOZZO et al., 2005).

A análise morfológica do sêmen é um parâmetro importante de qualidade e de modo geral permite descartar ejaculados que ultrapassam um determinado nível de células com anormalidades. Para machos que estão dentro dos padrões tolerados, a morfologia espermática parece ter valor limitado para predição da fertilidade (BERNARDI, 2008). Segundo o CBRA (1998), a avaliação das características morfológicas dos espermatozoides poderá ser feita em esfregaços corados ou em preparação úmida, analisadas em microscópio de contraste de fase ou de interferência diferencial, associados ou não.

Para a análise da morfologia, segundo Bortolozzo et al. (2005), devem ser observados no mínimo 200 espermatozoides por amostra, onde são considerados alterações de cabeça, peça intermediária e cauda. No entanto, as alterações totais não devem ultrapassar o valor de 20% para cada amostra (CBRA, 1998).

2.2.4 Funcionalidade da membrana (estresse térmico e osmótico)

Os principais fatores que afetam a morfologia espermática são temperatura e umidade elevadas, ocasionando redução no número de células normais e aumento na quantidade de espermatozoides com gota citoplasmática (proximal e distal). Por outro lado, constatou-se que a combinação desses dois fatores é mais deletéria à função testicular do que ambos agindo em separado (SURIYASOMBOON et al., 2006).

O teste de resistência osmótica (TRO) constitui um exame simples, barato e de fácil execução (GADEA, 2005). Nele ocorre uma resposta celular à uma solução hiposmótica,

havendo entrada de fluído nos espermatozoides, os quais apresentam edema e dobram ou enrolam a cauda (BERNARDI, 2008). Este teste avalia se as membranas espermáticas são funcionais, devendo constituir uma barreira semipermeável capaz de proteger a célula contra as influências do meio extracelular, como por exemplo os diluentes seminais (EINARSSON, 1992).

Os espermatozoides íntegros mantêm um equilíbrio osmótico com o ambiente em que se encontram. Quando os espermatozoides são expostos às soluções hiposmóticas, aqueles com membrana funcional sofrem aumento de tamanho, no intuito de estabilizar e refazer o equilíbrio osmótico, produzindo um inchaço típico na região da cauda. Ao sofrerem o choque osmótico, os espermatozoides tendem a promover um dobramento de cauda, indicando que possuíam membranas íntegras antes do teste (DELL'AQUA JUNIOR et al., 2002).

2.3 Diluentes de sêmen

O plasma seminal por si só não fornece proteção suficiente ao espermatozoide contra mudanças de temperatura. Assim, visando a conservação do ejaculado em baixas temperaturas, faz-se necessário o uso de um diluente, pois este tem como função proporcionar equilíbrio fisiológico, bioquímico e biofísico aos espermatozoides, sendo composto por uma variedade de substâncias quimicamente diferentes como glicose, antibiótico, sais, dentre outras. Ele tem também como finalidade aumentar o volume do sêmen, proteger o espermatozoide contra choque térmico, fornecer substratos necessários ao metabolismo espermático, manter o pH e inibir o crescimento bacteriano, mantendo assim a viabilidade dos espermatozoides até o momento de serem introduzidos no trato reprodutivo da fêmea (CORRÊA et al., 2001).

Na inseminação artificial de suínos, os diluentes utilizados têm sido tradicionalmente classificados em grupos (LEVIS, 2000), com base no período de manutenção da viabilidade e da capacidade fecundante do espermatozoide. Os principais diluentes de curta duração são o Beltsville Thawing Solution BTS e o Kiev, e preservam a viabilidade da célula espermática por até três dias. No Brasil, o diluente Kiev foi bastante utilizado até 1986, sendo em seguida substituído pelo BTS, especialmente devido ao menor custo e por proporcionar um aumento no período de armazenamento do sêmen (SCHEID, 1991).

Os diluentes considerados como de longa duração prolongam a vida dos espermatozoides por cinco dias ou mais, e podem ser usados quando o sêmen precisa ser

utilizado por períodos de tempo maiores ou transportado por longas distâncias, tendo como principais exemplos os diluentes Androhep e Reading (BORTOLOZZO et al., 2005).

Assim, a escolha do meio diluente deve considerar as condições em que a inseminação artificial irá ocorrer, o tempo que normalmente decorrerá entre o processamento das doses e a inseminação artificial, ou seja, se o sêmen se destina ao uso imediato ou armazenamento durante alguns dias (BORTOLOZZO et al., 2005).

2.3.1 Diluente água de coco

Ultimamente tem intensificado a busca por produtos alternativos que sirvam como diluentes e que proporcionem um ambiente favorável para conservar as células espermáticas. Tem sido utilizado produtos naturais, principalmente de origem vegetal, pois apresentam baixo risco de transmissão da doença. O aumento de viabilidade espermática leva à busca de diluentes alternativos para a criopreservação de espermatozoides, e entre eles está a água de coco que tem sido utilizada desde a década de 80 (NUNES; SALGUEIRO, 2011).

A água de coco é uma solução ácida, natural e estéril, composta de sais, proteínas, açúcares, vitaminas, gorduras neutras (NUNES; COMBARMOS, 1995), além de indutores da divisão celular e eletrólitos diversos, que conferem densidade e pH compatíveis com o plasma sanguíneo, proporcionando, os nutrientes necessários para manter a sobrevivência e viabilidade de gametas masculinos e femininos criopreservados (BLUME; MARQUES JR., 1994).

A Água de coco apresenta características que a classificam como um bom diluente de sêmen, já tendo sido utilizada com sucesso em diferentes espécies: suínos (AIRES; TONIOLLI, 2005), caprinos (AZEVEDO; TONIOLLI, 1999; NUNES; SALGUEIRO, 1999), ovinos (BRAZ et al., 2003), bovinos (ALBERTI, 2004), caninos (CARDOSO et al., 2005), felinos (SILVA et al., 2007), macacos (ARAÚJO et al., 2007) e humanos (NUNES, 1998).

Sabe-se que os espermatozoides são metabolicamente mais ativos em diluentes adicionados de água de coco e de citrato de sódio do que adicionados de carbonato de cálcio (TONIOLLI; MESQUITA, 1990). O efeito benéfico da água de coco sobre os espermatozoides é devido a uma fração neutra que contém vários ânions e cátions, açúcar livre, sorbitol e inositol, verificando-se que não contém nenhuma substância desconhecida com propriedades especiais (JOHNSON, 1965).

A água de coco em pó (ACP) surgiu devido aos excelentes resultados obtidos nos primeiros estudos com água de coco. Então começaram os estudos da sua forma processada, visto que a água de coco em pó proporciona uma maior estabilidade e longevidade do seu uso

e supera qualquer outra tecnologia de conservação, uma vez que ele mantém as mesmas propriedades do produto natural (NUNES, SALGUEIRO, 2011). A ACP foi então desenvolvida com o intuito de simplificar sua utilização como diluente (SALGUEIRO et al., 2002). Além disso, a ACP pode ser facilmente armazenada e enviada para regiões onde o coco não é encontrado (CARDOSO et al., 2005).

2.4 Conservação do sêmen

Uma das principais expectativas de uso da IA em suínos depende do desenvolvimento de novas técnicas de armazenamento do sêmen (CAMERON, 1998). O êxito da IA está relacionado à capacidade do diluente em conservar os espermatozoides em condições adequadas durante a estocagem do sêmen (JOHNSON et al., 1988; WOELDERS, 1992). Nesse sentido, PAQUIGNON et al. (1987) destacaram a necessidade de realizar estudos efetivos em busca de diluentes que possam preservar as qualidades fecundantes do sêmen diluído de cachaços por maior período de tempo possível, a fim de otimizar o seu uso, melhorar o manejo e causar menor desgaste aos reprodutores.

2.4.1 Uso da refrigeração do sêmen

O sêmen suíno tem sido tradicionalmente armazenado em temperaturas entre 15 e 18 °C após a diluição (LAFOREST; ALLARD, 1996). Essa temperatura, entretanto, é limitante para o sêmen armazenado por períodos prolongados, em virtude de não reduzir muito o metabolismo dos espermatozoides, permitindo acúmulo de metabólitos, que podem interferir na motilidade espermática. Além disso, essa faixa de temperatura não impede a multiplicação bacteriana, a qual influencia na qualidade do ejaculado, podendo limitar o período máximo de armazenamento (WEITZE, 1990).

2.4.2 Uso da criopreservação do sêmen

A congelação de ejaculados de cachaços representa apenas 1% do sêmen usado a nível mundial, apesar do mesmo estar disponível para uso sob esta forma desde a década de 1970 (SARAVIA et al., 2005).

A criopreservação, que supera o limite temporal no uso de um ejaculado, por sua vez ainda apresenta o grave problema de reduzir drasticamente a capacidade fertilizante da população espermática. Restrições ao uso do sêmen congelado apresentam-se também sob a forma de uma variação individual de ejaculados de reprodutores que suportam ou não a criopreservação, além do baixo rendimento no tocante ao número de doses produzidas e de

métodos laboriosos de processamento de material espermático visando a congelção (JOHNSON, 1985; REED, 1985) visto que a criopreservação exige um maior cuidado para evitar o choque térmico, sendo então necessário um treinamento para a manipulação do sêmen durante o protocolo e de materiais de laboratório mais sofisticado.

Por isso, a nível comercial, apenas as empresas de melhoramento genético usam sêmen congelado para transferência de material genético de alta qualidade entre granjas localizadas em diferentes países. Este tipo de utilização tem como propósito a melhoria genética e a formação dos bancos de dados, usando sêmen do mesmo cachão em diversos rebanhos, dentro dos programas de melhoramento genético. Desta forma, o uso de sêmen congelado de cachões permanece restrito à preservação e transporte por longas distâncias de material genético de alto valor (SCHEID; SILVEIRA, 2002).

O processo de criopreservação das células espermáticas resulta em diminuição da fertilidade quando comparada com sêmen refrigerado. Esta redução ocorre devido a dois aspectos que ocorrem durante o protocolo de criopreservação, que são: morte celular e danos na capacidade funcional dos espermatozoides que sobrevivem (WATSON, 2000).

O estresse inicial se dá quando o espermatozoide passa da temperatura corporal para 5 °C (SQUIRES et al., 1999). Isto ocorre devido à fase de transição da membrana plasmática, do estado líquido cristalino para o estado de gel (GRAHAM, 1996; MEDEIROS et al., 2002). Outros momentos que as células espermáticas sofrem danos é na formação de cristais de gelo intracelular e na desidratação excessiva que ocorre pelo aumento da concentração de sais que durante a criopreservação (KASAI, 1996).

Isto pode ser conseguido através da remoção da maior parte de água de dentro das células, para que não ocorra a formação de cristais, ou ainda a utilização de substâncias que impeçam que a célula desidrate excessivamente que, do mesmo modo, provoca injúrias as mesmas (VISINTIN, 2002). Este efeito pode ser minimizado pelo controle da taxa de resfriamento entre as temperaturas de 19 a 8 °C, pela adição de lipídios, gema de ovo, ou de lipoproteína ao diluente (GRAHAM, 1996), além do uso de curvas de resfriamento lentas.

Segundo Salamon e Maxwell (2000), apenas 20-30% dos espermatozoides permanecem biologicamente não danificados após o processo de congelção e descongelção. Quanto aos padrões seminais desejáveis para sêmen congelado, considera-se fora dos mesmos os ejaculados que apresentarem motilidade progressiva menor que 20%, anormalidades espermáticas maiores que 50% e o número total de células inferior a 5×10^9 spz/dose inseminante (CORRÊA et al., 2001).

No entanto, a avaliação *in vitro* da viabilidade espermática pós-descongelação deve ser realizada através de vários exames, visto que qualquer teste isoladamente é insuficiente para identificar cachacos ou ejaculados com baixa congelabilidade (JOHNSON, 1985).

Vários são os testes utilizados para verificação *in vitro* da qualidade e viabilidade espermática pós descongelação, dentre os quais podem ser citados: motilidade espermática e integridade acrossomal (JOHNSON et al., 1981); concentração extracelular de enzimas e teste de termorresistência (TULI; SINGH; MATHAROO, 1982); o conteúdo seminal de ATP (AALBERS; JOHNSON; RADEMAKER, 1985).

2.5 Proteômica do sêmen

A proteômica é uma ferramenta utilizada para entender o funcionamento dos genes, onde o termo proteoma foi proposto como sendo todo o conteúdo de proteínas expressas por um genoma (WILKINS et al., 1997). Ela é uma das principais alternativas para compreender as interações do plasma seminal com a superfície dos espermatozoides, podendo ser utilizada como um modelo usual para o estudo desta relação (STRZEZEK et al., 2005). Muitas proteínas do plasma seminal de várias espécies também têm sido analisadas através do dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) ou por eletroforese em gel de poliacrilamida dimensional (KOWALSKI et al., 2003; LAHNSTEINER; MANSOUR; BERGER, 2004).

Uma das ferramentas mais utilizadas para o estudo do proteoma bem como para a separação e caracterização dos diversos polipeptídeos, proposta por O'FARREL (1975) é a eletroforese bidimensional, que consiste em separar, sob a influência de um campo elétrico, as moléculas através de suas cargas. Para isto, são realizadas duas corridas eletroforéticas sequenciais. Primeiro ocorre a focalização isoeletrica (IEF), que separa as proteínas próximo ao seu ponto isoeletrico, que pode ser de até 0,01 unidade de pH. Por isso, essa técnica foi denominada focalização isoeletrica (VOET; VOET, 2006).

Logo após a focalização isoeletrica, ocorre a eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS-PAGE que separa as proteínas de acordo com suas massas moleculares, pois o gel de poliacrilamida age como uma peneira molecular, em que as moléculas de menor peso migram mais facilmente na vertical do gel e as moléculas de maior peso molecular ficam retidas na porção superior do gel. A porosidade deste gel de poliacrilamida pode ser escolhida, sendo que quanto maior a concentração de acrilamida menores serão os poros da malha formada (ROCHA et al., 2005).

A eletroforese 2D resulta da combinação de duas técnicas: a focalização isoeletrica, seguida por uma separação de SDS – PAGE. Quando bem sucedida obtêm-se um gel de

poliacrilamida contendo numerosos spots, bem separados, cada um correspondendo a uma proteína (SANTOS et al., 2004).

2.5.1 Composição da membrana plasmática do espermatozoide

A membrana espermática apresenta uma composição mista de fosfolipídios que pode diferir de espécie para espécie, além da temperatura de transição de fase que pode ser variável para cada tipo de fosfolipídio (BUHR et al., 1994).

Durante o processo de resfriamento visando à conservação do ejaculado, a separação lateral de fases pode ocorrer e as proteínas podem ficar agrupadas e excluídas dos arranjos hexagonais dos lipídios gelificados, permanecendo em locais onde há lipídios ainda em estado fluído. Pelo fato das proteínas da membrana ficarem localizadas em ambiente lipídico não fisiológico, a função das mesmas, importante para a integridade estrutural ou para o funcionamento das bombas de íons, pode ser afetada (WATSON, 1996; WOELDERS, 1997; LEVIS, 2000).

Em função da separação de fases, há um aumento da permeabilidade da membrana com perda de cátions e enzimas, redução da atividade enzimática e perturbações nos processos de difusão controlados por ela (DE LEEUW et al., 1990). Além disso, durante o resfriamento, o desequilíbrio iônico intra e extracelular podem reduzir a motilidade espermática (WATSON, 1996). Na faixa de temperatura de 25 a 5 °C, ocorre a redução da fluidez dos lipídios da membrana do espermatozoide suíno, o que poderia explicar sua maior sensibilidade ao resfriamento (BUHR et al., 1994).

Um componente importante que participa da integridade da membrana plasmática é o colesterol. A relação colesterol:fosfolipídios da membrana plasmática do espermatozoide suíno é mais baixa (0,12) do que a dos bovinos (0,38) e ovinos (0,36), podendo ser outro fator responsável pela sua maior sensibilidade a baixas temperaturas (DE LEEUW et al., 1990).

3 JUSTIFICATIVA

O aumento frequente do uso de programas de inseminação artificial em granjas comerciais de suínos, exige cada vez mais a melhoria e o desenvolvimento de técnicas mais aprimoradas que possibilitem um aumento na produção dessas granjas. Com isso, se faz necessário o aperfeiçoamento de biotécnicas nas unidades de reprodução, que possam ser utilizadas como ferramentas para a otimização da utilização da inseminação artificial (CORRÊA et al., 2001).

A conservação de sêmen suíno para uma posterior utilização deste na inseminação artificial, se faz através de seu resfriamento, sendo que a viabilidade do sêmen é limitada em até três dias. Para proporcionar um aumento desta viabilidade por um período mais prolongado, necessita-se do uso do sêmen congelado (HESS; LUDWICK; TEAGUE 1960). No entanto, a congelação do sêmen ainda está associada a baixos índices produtivos e reprodutivos, quando relacionada com os valores obtidos com o uso de sêmen resfriado (WOELDERS, 1997).

Apesar dos dados atuais de produtividade com sêmen congelado serem desanimadores em termos de perspectivas do uso da técnica em grande escala em rebanhos comerciais, alguns pesquisadores apontam para um futuro promissor da técnica, com os avanços das novas tecnologias e equipamentos de congelação de sêmen (WOLDERS; TEN NAPEL, 2005).

Entre as vantagens da criopreservação, destacam-se também a otimização do uso de machos com comprovada superioridade genética, com a possibilidade do armazenamento de sêmen por tempo ilimitado e a quebra das barreiras geográficas, que torna possível a remessa de doses para qualquer parte do mundo (BARRETO et al., 2008). No entanto, alguns animais apresentam resultados ruins quanto à congelação de sêmen e as características particulares que levam alguns ejaculados a resistirem ao processo de criopreservação melhor do que outros, permanece sem ser identificada (CASAS et al., 2010)

A congelabilidade do sêmen suíno parece ser mais dependente de características individuais do que do processo de criopreservação em si (MEDRANO et al., 2009), e, assim, a capacidade de um suíno produzir sêmen resistente ao choque térmico, tem várias implicações sobre as suas características próprias de ejaculação. Trabalhos anteriores têm relacionado este aspecto com a origem genética de suínos (THURSTON et al., 2002; ROCA et al., 2006), o que também explica o porque que ejaculados coletados a partir do mesmo animal tendem a apresentar os mesmos resultados para a congelabilidade (MEDRANO; HOLT, 1998; RATH et al., 2009).

Como fonte inovadora para a viabilização do uso de sêmen congelado, estudos tem sido realizados a fim de identificar substâncias presentes no sêmen que possibilitem a busca por marcadores de congelabilidade através da caracterização de proteínas específicas envolvidas na atividade espermática (COLLARES, 2005). Desta forma, essa identificação pode ocasionar uma melhoria nos resultados com o uso de sêmen congelado, já que será possível detectar a presença de determinadas proteínas que estão associadas a sêmens viáveis após a descongelação.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

A membrana plasmática do espermatozoide suíno, apresenta em sua constituição, proteínas que podem ser utilizadas como marcadores biológicos de congelabilidade para o ejaculado de diferentes reprodutores.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Associar as proteínas da membrana plasmática do espermatozoide suíno com a proteção espermática ao processo de criopreservação do sêmen.

5.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o vigor e a motilidade espermática durante a curva de resfriamento;
- Avaliar a qualidade espermática do sêmen suíno, analisando o vigor, a motilidade, a morfologia e a integridade da membrana após a descongelação;
- Testar a Água de Coco em Pó (ACP-103[®]) como diluente de criopreservação do sêmen suíno;
- Separar os animais em grupos quanto aos resultados da congelabilidade, classificando-os em ejaculados de boa congelabilidade (GFEs) e de congelabilidade ruim (PFES);
- Avaliar o mapa eletroforético da membrana espermática do sêmen suíno;
- Comparar os spots e a de intensidade com que estes estão expressos nos géis dos grupos GFEs e PFES, e correlacioná-los com proteção espermática.

6 CAPÍTULO I**Aspectos morfofisiológicos dos espermatozoides**

Morphophysilogic aspects of sperm

Daianny Barboza Guimarães; Ricardo Toniolli;

Aspectos morfofisiológicos dos espermatozoides

Morphophysiological aspects of sperm

Daianny Barboza Guimarães¹; Ricardo Toniolli²

¹Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen – FAVET/UECE.

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – FAVET/UECE, Av. Paranjana, 1700. Campus Itaperi, Fortaleza, Ceará, Brasil. CEP: 60.740-000. E-mail: toniolli@roadnet.com.br

- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -

RESUMO

A inseminação artificial é uma técnica de grande simplicidade na sua execução, sendo utilizada como um meio de disseminação da espécie, e é bastante utilizada na maioria das granjas produtoras de suinocultura, mas. Porém, deve ser realizada com todos os cuidados para ser eficiente, fazendo-se necessário uma criteriosa avaliação da qualidade do sêmen para que seja obtido uma boa produção. Desta forma, o presente estudo objetiva apresentar as características morfológicas e fisiológicas da célula espermática, enfatizando a composição da membrana plasmática dessa célula e sua importância nos processos biológicos. Diversos são os trabalhos que demonstram a importância da avaliação seminal para se obter um controle das características estruturais do espermatozoide, para que estes estejam aptos para uma futura fecundação. Sendo assim, a análise morfológica e a análise de integridade da membrana celular são de fundamental importância para determinar a real situação da célula espermática.

Palavras-chave: Espermatozoide; Morfologia e Integridade da membrana plasmática.

ABSTRACT

Artificial insemination is a technique of great simplicity in its implementation and is used as a means of dissemination of the species, and is widely used in most pig producing farms, but. However, it should be done with great care to be effective, making it necessary a careful assessment of semen quality is obtained for a good production. Thus, this study aims to present the morphological and physiological characteristics of the sperm cell, emphasizing the composition of the plasma membrane of that cell and its importance in biological processes. There are several studies that

demonstrate the importance of evaluating seminal to obtain control of the structural characteristics of sperm, so they are suitable for future fertilization. Thus, the morphological analysis and the analysis of cell membrane integrity are of fundamental importance to determine the real situation of the sperm cell.

Keywords: sperm; Morphology and Integrity of the plasma membrane.

INTRODUÇÃO

A suinocultura tecnificada utiliza cada vez mais a inseminação artificial (IA) como componente do manejo reprodutivo, principalmente devido ao surgimento de linhagens genéticas de machos terminais que agregaram às carcaças qualidades exigidas pela tipificação da indústria de carnes (BORTOLOZZO et al., 2005). A utilização extensiva da IA é feita através do uso de sêmen resfriado, que proporciona resultados de fertilidade excelentes quando comparados aos da monta natural (SCHEID et al., 1986).

Após a IA, o sêmen é exposto a um ambiente diferente, com alteração significativa na função espermática, ocorrendo uma diminuição do número de espermatozoide no trato genital feminino nas primeiras horas (BORTOLOZZO et al., 2005). No entanto, para que ele seja considerado viável e potencialmente fértil é necessário que possua morfologia normal. A qualidade espermática dos ejaculados é um dos principais fatores considerados para a seleção de reprodutores em uma criação (TONIOLLI, 1999), associada a uma produção de espermatozoides férteis e boa capacidade de realizar a monta. Para tal finalidade, devem ser adotadas práticas de manejo com o reprodutor desde sua fase pré-púbere, pois as falhas ocorridas neste período, podem acarretar problemas reprodutivos futuros (COLENBRANDER & KEMP, 1990).

Anormalidades morfológicas espermáticas têm sido associadas à infertilidade na maioria das espécies (SAACKE, 2001). As causas dos defeitos da estrutura do espermatozoide podem ser de cunho ambiental, genético ou uma combinação de ambos (CHANDLER & ADKINSON, 1990), influenciando a formação normal do espermatozoide (BORTOLOZZO et al., 2005). A avaliação quantitativa do ejaculado tem por objetivo mensurar a sua capacidade fecundante, não informando de maneira definitiva se um reprodutor é fértil ou não. Também é empregada para detectar alterações que comprometem a capacidade fecundante do espermatozoide (BORTOLOZZO et al., 2005), pois sua qualidade tem grande importância sobre os

resultados de fertilidade (SCHEID et al.,1995). Esse trabalho teve por objetivo discorrer sobre diferentes características espermáticas de cunho morfológico e fisiológico, visando o uso do sêmen na reprodução animal.

REVISÃO DE LITERATURA

Desenvolvimento testicular e espermatogênese

Alguns trabalhos têm relacionado o tamanho testicular com a produção e reservas espermáticas, onde testículos maiores estariam correlacionados com concentrações espermáticas mais elevadas, pois sendo a produção diária de espermatozoides constante, por grama de parênquima testicular, testículos maiores teriam uma maior capacidade produtiva.

A produção de espermatozoides ocorre nos túbulos seminíferos, no interior dos testículos. Um dos principais componentes do túbulo seminífero é a Célula de Sertoli, que está diretamente ligada ao processo de desenvolvimento testicular (PELLINIEMI, 1975). A migração das demais células somáticas do testículo, dentre as quais a célula de Leydig, ocorre sob a influência de fatores como Sox 9, produzidos pelas células precursoras das células de Sertoli (KANAI et al., 2005). Neste contexto, um padrão similar de crescimento das células de Sertoli e de Leydig, sugerem claramente a interação funcional entre estes dois tipos celulares, durante o desenvolvimento dos testículos em suínos (FRANÇA et al., 2000).

Nos suínos a espermatogênese é um processo altamente organizado que ocorre nos túbulos seminíferos por cerca de 35 a 45 dias (FLOWERS, 1998), sendo o processo de formação dos espermatozoides, a partir da divisão e diferenciação das células de linhagem espermatogênica (CORRÊA, 2001). O gameta masculino é produzido nos túbulos seminíferos dos testículos (CHENG et al., 2004) por um longo processo que envolve várias divisões e transformações das células germinativas primordiais, dividido em três etapas: espermatocitogênese, espermiogênese e espermiação (GARNER & HAFEZ, 2004).

Na primeira etapa, as espermatogônias aumentam e sofrem várias mitoses, com objetivo de se transformarem em espermatócitos primários ($2n$). Estes, por sua vez, sofrem a primeira divisão meiótica (reducional), resultando em dois espermatócitos secundário (n), que por sua vez sofrem a segunda divisão meiótica (equacional), dando origem as espermátides (n) (BARTH & OKO, 1989). Na segunda etapa, ocorre a diferenciação das espermátides, com a perda de boa parte do seu citoplasma e organelas

e dando origem a uma célula contendo núcleo e acrossomo. Por fim, os espermatozoides formados são liberados para a luz do túbulo seminífero (JOHNSON et al., 2000).

Características fisiológicas e morfológicas dos espermatozoides

Fisiologia espermática

O espermatozoide é uma célula alongada, formada por duas regiões altamente especializadas: a cabeça, na qual está contido o DNA, pequena quantidade de citoplasma e o acrossomo, que é uma vesícula contendo enzimas hidrolíticas, vital para a penetração do espermatozoide através da zona pelúcida; e o flagelo, envolvido com a motilidade da célula. Neste segmento encontra-se a peça intermediária, contendo as mitocôndrias, relacionadas com a produção de energia (YANAGIMACHI, 1994).

A peça intermediária estende-se do ponto de união da cauda com a cabeça espermática até o final da hélice mitocondrial, importante para a disponibilização de energia através da produção de ATP via fosforilação oxidativa (MANELLA, 2000). Na cauda, desaparece a hélice mitocondrial, mas há continuidade dos filamentos do axonema, recobertos por uma bainha fibrosa (SETCHELL, 1993), que é uma estrutura do citoesqueleto que fornece um suporte no controle e restrição do movimento flagelar (MORTIMER, 1997).

Toda a característica estrutural especializada do espermatozoide está voltada para sua atividade funcional única, ou seja, a fecundação do oócito, com união dos pró-núcleos masculino e feminino e produção do zigoto (EDDY & O'BRIEN, 1994). Há uma diferenciação na composição da membrana plasmática nas diferentes estruturas do espermatozoide, relacionada com as funções especializadas de cada segmento da célula. Assim, moléculas envolvidas na reação acrossômica estão presentes no acrossomo anterior; moléculas envolvidas na fusão do espermatozoide com o oócito estão presentes no acrossomo posterior e moléculas envolvidas na atividade flagelar estão associadas com a membrana plasmática do flagelo (EDDY & O'BRIEN, 1994).

Modificações na composição da membrana plasmática podem ocorrer durante o processo de resfriamento do sêmen, onde a separação de fases e as proteínas podem ficar agrupadas e excluídas dos arranjos hexagonais de lipídios, permanecendo em locais onde há lipídios ainda em estado fluído. Pelo fato das proteínas de membrana ficarem localizadas em ambiente lipídico não fisiológico, a função das mesmas, importante para a integridade estrutural da célula, pode ser afetada (LEVIS, 2000). Em função da separação de fases, há aumento da permeabilidade da membrana com perda

de cátions e enzimas, redução de atividade enzimática e de processos de difusão na membrana (DE LEEUW et al., 1991).

Um componente importante que participa da integridade da membrana plasmática é o colesterol. No entanto, a relação colesterol:fosfolipídios da membrana plasmática do espermatozoide suíno é mais baixa (0,12) do que em bovinos (0,38) e ovinos (0,36), podendo ser outro fator responsável pela sua maior sensibilidade ao frio (DE LEEUW et al., 1990).

Segundo Hammersted et al. (1990) as membranas espermáticas apresentam-se em um estado de fluidez, sendo esta característica um pré-requisito para o desempenho de suas funções. Os principais fatores que afetam a fluidez são a relação entre fosfolipídios e colesterol e a temperatura à qual a membrana é exposta. Sendo assim, altas temperaturas ambientais têm sido relacionadas à redução da fertilidade, pelos efeitos negativos sobre a espermatogênese e a libido (PELTONIEMI et al, 1999). No entanto, nem sempre tem sido possível mostrar os efeitos da temperatura sobre os índices reprodutivos (POTTER, 1998).

Desta forma, a integridade da membrana espermática exerce um papel fundamental na sobrevivência do espermatozoide no trato genital da fêmea e na manutenção de sua capacidade fertilizante (PARKS & GRAHAN, 1992).

Morfologia espermática

O espermatozoide é constituído de cabeça e flagelo, e essas estruturas variam em formatos e dimensões entre espécies. A cabeça espermática consiste, em sua maior parte, de um núcleo envolvido pelo envelope nuclear, e formado por uma massa condensada de DNA, a cromatina (JOHNSON, 1994). Esta é sustentada inicialmente por histonas, ricas em lisina, que são substituídas pelas protaminas, ricas em cisteína (SETCHELL, 1993), o que ocorre principalmente na fase do acrossoma e maturação, durante a espermatogênese.

A membrana plasmática do espermatozoide apresenta uma composição mista de fosfolipídios que pode diferir de espécie para espécie (BUHR et al., 1994). Ela também apresenta modificações na sua composição ao longo do processo de espermatogênese, trânsito e armazenagem no epidídimo, ejaculação, depósito no trato genital feminino e, finalmente, capacitação e penetração do oócito (LENZI et al., 1996), sendo uma estrutura importante para a funcionabilidade celular e capacidade fertilizante (PARKS & GRAHAN, 1992).

Recobrando até dois terços da porção anterior da cabeça, entre o lado interno da membrana plasmática e o núcleo, há o acrossoma, que contém enzimas hidrolíticas (hialuronidase e acrosina) (JOHNSON, 1994). Ele se dispõe sobre o núcleo na porção anterior da cabeça, tendo a membrana acrossomal interna e externa. Na região pós-acrossomal encontram-se microtúbulos (colo) onde a cauda é inserida (BARTH & OKO, 1989). No centro da cauda encontra-se o axonema, composto por nove microtúbulos localizados na periferia do cilindro e por dois microtúbulos simples centrais (GARNER & HAFEZ, 2004). Na peça intermediária, encontra-se uma espiral mitocôndrial (MANELLA, 2000).

De maneira geral, a estrutura dos espermatozoides apresenta um papel muito importante nos resultados posteriores de fertilização e prenhez (ZAMBONI, 1992). A morfologia, associada com a determinação da concentração e motilidade espermática são componentes da avaliação da qualidade do ejaculado (SUTKEVICIENE et al., 2009).

A análise morfológica do sêmen, permite a observação dos defeitos individuais dos espermatozoides, bem como a determinação da relação máxima entre célula normais e com defeitos, de forma a se poder utilizar o sêmen sem que ocorram perdas significativas na fertilidade. Por ser um exame essencial, pode-se afirmar que as duas principais funções do espermatozoide maduro, motilidade e poder fecundante, dependem do funcionamento harmonioso entre suas três regiões (ANJOS, 2006), apesar de que, em ejaculados com parâmetros morfológicos normais, não se pode estabelecer o nível de real fertilidade do ejaculado (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ & ERIKSSON, 2000).

Patologia espermática

O sistema de classificação para morfologia espermática foi inicialmente descrito por Langerlöf (1934). Mais tarde, Bloom (1950), subdividiu os defeitos morfológicos em primários e secundários. Este sistema foi novamente revisado por Rao (1971), que classificou os defeitos entre maiores e menores, de acordo com o prejuízo causado à fertilidade. Posteriormente, Saacke et al. (1990) propuseram um novo modelo de classificação espermática, sendo defeitos compensatórios, que estão relacionados com incapacidade ou dificuldade de chegar ao local de fecundação e defeitos não compensatórios, que estão relacionados com a incapacidade de fecundação do ovócito.

Alguns problemas podem ocorrer durante a espermatogênese e influenciar na formação do espermatozoide, gerando células anormais. Segundo Leidl et al. (1999), as anormalidades espermáticas podem ser classificadas de acordo com sua origem, em Primárias, de origem intra-gonadal, a qual é indicativo de problemas na espermatogênese; Secundárias, de origem extra-gonadal, onde é um indicativo de disfunção epididimária; E terciárias, de origem exógena, advindas de manipulação pós-ejaculação.

Alguns estudos têm demonstrado que a fertilidade de uma amostra de sêmen cai progressivamente à medida que se aumentam as anormalidades morfológicas de espermatozoides (SAACKE et al., 2000). Isto é particularmente observado em amostras com alta porcentagem de anormalidades de cabeça (SAACKE et al., 2000), vacúolos nucleares (PILIP et al., 1995) e anormalidades acrossomais (THUNDATHIL et al., 2002).

A alta frequência de espermatozoides morfológicamente anormais ou a alta incidência de um único defeito podem reduzir a fertilidade. As anormalidades morfológicas são classificadas de diversas formas, sendo que algumas classificações dividem as alterações de acordo com a região da célula onde a mesma ocorreu como: cabeça, peça intermediária ou cauda. Outras simplesmente dividem os defeitos em primários e secundários, ou defeitos maiores e menores (HOWARD & PACE, 1988).

Os defeitos considerados maiores são as alterações de acrossoma, gota citoplasmática proximal, espermatozoide subdesenvolvido, cabeça isolada patológica, cabeça estreita na base, cabeça piriforme, cabeça pequena anormal, cabeça com “Pouch formation” (invaginações na membrana nuclear), formas teratológicas, peça intermediária em forma de saca-rolhas, peça intermediária com pseudo-gota, cauda fortemente dobrada ou enrolada e cauda enrolada na cabeça. Já os defeitos classificados como menores são o acrossoma desprendido, gota citoplasmática distal, cabeça delgada, cabeça pequena normal, cabeças gigantes, curtas e largas, cabeça isolada normal, peça intermediária com implantação abaxial, retroaxial e oblíquo e cauda dobrada/enrolada (ANJOS, 2006).

As alterações morfológicas encontradas à nível de acrossomo (forma irregular, enrugado ou destacado), podem ser ocasionadas devido ao choque térmico ou manipulação errônea do sêmen. A nível de peça intermediária pode ocorrer o destacamento de cabeça; a inserção paraxial da cauda e o “Corkscrew defect” (degeneração do plasmalema). Já as patologias da cauda, podem ser: cauda enrolada ou

fortemente enrolada e dobrada, que podem ser de origem genética ou ocasionadas devido a choque osmótico ou térmico e a disfunções do epidídimo (PAPA et al., 2011), identificadas através de técnicas de microscopia de campo claro e/ou contraste de fases (BARTH & OKO, 1989).

Avaliação da célula espermática

A avaliação espermática tem como objetivo principal predizer o potencial fertilizante de um ejaculado, identificar aqueles com problemas, e estabelecer características confiáveis que possam ser utilizadas como indicadores de fertilidade (AMANN & HAMMERSTEDT, 1993). A análise morfológica do sêmen *in natura* é importante para se avaliar a qualidade do ejaculado, ajudando na identificação da causa de problemas de infertilidade e subfertilidade (GARCÍA RUVALCABA et al., 1999). De acordo com García Casado et al. (2007) em programas de inseminação artificial, a análise espermática é de extrema importância, pois é responsável pela escolha de ejaculados de mais alta qualidade.

O desenvolvimento de ensaios laboratoriais para predizer a capacidade fecundante do sêmen tem instigado os pesquisadores. Entretanto, sabe-se que nenhum teste laboratorial isolado pode estimar este possível potencial de fertilidade (ARRUDA et al., 2003).

Os métodos empregados para avaliação, devem ser rápidos, econômicos e práticos, de modo a manter a qualidade inicial do ejaculado. Os parâmetros de qualidade a serem considerados no ejaculado logo após sua coleta, consistem em determinar: volume, aspecto, odor, coloração, motilidade, vigor, concentração e morfologia (CORRÊA, 2001).

A avaliação qualitativa do ejaculado é realizada com o objetivo de predizer o potencial reprodutivo de um animal, não informando de maneira definitiva se um determinado macho é fértil ou não. Também é empregada para a identificação de possíveis causas de infertilidade no rebanho ou para detectar a tempo alterações que possam comprometer a capacidade fecundante de um ejaculado (BORTOLOZZO et al., 2005).

A qualidade do sêmen tem grande importância sobre os resultados de fertilidade na inseminação artificial (SCHEID et al., 1995). Ejaculados com motilidade espermática superior a 70% e defeitos maiores e menores inferiores a 10% e 20%,

respectivamente, podem ser considerados aceitáveis para uso em IA. Bonet (1990) admite patologias espermáticas totais abaixo de 25%.

Durante a avaliação dos ejaculados, é necessário considerar indicadores mais específicos da condição espermática. Técnicas que indiquem alterações de morfofuncionalidade nos compartimentos celulares e/ou organelas devem auxiliar sobremaneira a identificação e seleção de grupos de gametas mais aptos a executar os eventos imprescindíveis à fecundação (GARCIA, 2006).

Teste para análise da viabilidade do sêmen

As análises de vigor e motilidade são análises subjetivas realizadas em microscopia óptica, e correspondem a um dos parâmetros analisados para a viabilidade do sêmen. Segundo o CBRA (1998), a análise de motilidade consiste em estimar o percentual de células que apresentam qualquer tipo de movimento. Já a análise de vigor, representa a velocidade e o tipo de movimento que os espermatozoides realizam (CORRÊA et al., 2001). Segundo Bortolozzo et al. (2005), este parâmetro é estabelecido com base em um escore de 0 a 5, onde é levado em consideração o tipo e a direção do movimento, onde 0 representa a ausência de movimento do espermatozoide, e 5 representa um movimento vigoroso e veloz dos espermatozoides. Apesar desta análise subjetiva, seguindo-se as características pré-determinadas pela tabela de análise de vigor espermático (TONIOLLI, 1996), os resultados obtidos para esta característica, por pessoas bem treinadas, são bastante homogêneos.

Testes para análise de Morfologia espermática

O exame de morfológico faz parte da avaliação qualitativa do ejaculado e permite a determinação da frequência de anormalidades espermáticas e do percentual total de alterações na amostra de sêmen. É utilizado como indicativo do potencial fecundante do ejaculado, baseado na localização do defeito. Este exame fornece um importante parâmetro de qualidade, sendo uma ferramenta fundamental para o descarte do ejaculado e até mesmo do reprodutor (BORTOLOZZO et al., 2005). Este exame deve ser realizado periodicamente ou quando o sêmen apresentar suspeita de alterações morfológicas, apesar de que para machos que estão dentro dos padrões tolerados, a morfologia espermática parece ter valor limitado para predição da fertilidade (BERNARDI, 2008).

O exame morfológico da célula espermática tem sido utilizado de forma rotineira para seleção e controle de qualidade do sêmen, no entanto uma avaliação individual, não permite prever a fertilidade de uma amostra de sêmen, sendo recomendada a avaliação conjunta de outras características espermáticas (CHACÓN et al., 2001). De forma geral, as características morfológicas são analisadas utilizando-se esfregaços com corantes tais como: Wright, Rosa de Bengala, Giemsa, eosina-nigrosina, Karras, Azul de Bromofenol e outros.

Para identificação das patologias, diversas técnicas têm sido usadas, incluindo microscopia de campo claro, contraste interdiferencial (DIC), preparações utilizando corantes e microscopia eletrônica de transmissão (BARTH & OKO, 1989). Como o espermatozoide é uma célula translúcida sua visualização sob microscopia óptica comum não é muito nítida para avaliação do contorno celular. A técnica da câmara úmida, na qual os espermatozoides não são corados, deve ser realizada utilizando-se microscopia capaz de destacar os contornos celulares, como microscopia de contraste de fase (CELEGHINI, 2005).

Segundo Bortolozzo et al. (2005), devem ser observados no mínimo 200 espermatozoides por amostra, onde são consideradas as alterações de cada segmento da célula, pois os defeitos podem ocorrer em um ou em mais segmentos simultaneamente, sendo desta forma considerado apenas o defeito mais grave. Ao final da análise, o total de alterações obtido deve ser inferiores a 20% para o ejaculado poder ser usado (CBRA, 1998). Rodríguez-Martínez & Eriksson (2000) consideram como aceitável quando as anormalidades de cabeça não ultrapassam 10% e os defeitos na peça intermediária e flagelo 5% e 10%, respectivamente.

Testes para análise da integridade e funcionalidade da membrana plasmática

A manutenção da integridade e funcionalidade desta membrana é de fundamental importância, uma vez que ela participa de importantes funções, tais como: o metabolismo espermático, a capacitação, a reação acrossomal, a ligação e penetração do ovócito (BRITO et al., 2003). Sendo assim, a avaliação da funcionalidade das membranas parece ser um importante parâmetro para avaliar a capacidade fecundante dos espermatozoides.

Muitos estudos baseiam-se a idéia de que a membrana plasmática intacta impede a penetração de certos corantes na célula espermática. Estes estudos foram realizados com avaliações de esfregaços secos de corante supravital, como eosina e

nigrosina (HANCOCK, 1951) e posteriormente com azul de tripan (WILSON et al., 1969). A avaliação da integridade da membrana plasmática em espermatozoides com o uso de sondas fluorescentes citam o brometo de etídeo (HALANGK et al., 1984), que penetra apenas em células com lesão de membrana, tendo especificidade por DNA (PAL et al., 1998).

No entanto, outros corantes fluorescentes com propriedades similares são usados, tais como o Iodeto de Propídeo (CELEGHINI, 2005) e SYBER-14 (GARNER et al., 1999). Dentre estes, o Iodeto de Propídeo vem sendo mais amplamente utilizado devido à facilidade de preparação e aplicação da técnica, estabilidade e eficiência na avaliação da integridade da membrana plasmática (GRAHAM et al., 1990). Ele se liga ao DNA de espermatozoides com membrana danificada e cora o núcleo de vermelho (GARNER et al., 1999).

Quanto a viabilidade da membrana plasmática, o método para esta avaliação baseia-se no princípio fisiológico do teste hiposmótico (HOS - JEYEDRAN et al., 1984), que consiste na exposição do espermatozoide a uma solução de baixa osmolaridade de modo que haja passagem de água através da membrana espermática, para atingir um equilíbrio osmótico entre os compartimentos intra e extracelular, ocorrendo apenas se a membrana estiver intacta. A cauda é particularmente susceptível a esta condição, torcendo-se em forma helicoidal. Esta situação é facilmente observada em microscópio de contraste de fase (ROTA et al., 2000). Esta reação é um sinal de que o transporte de água através da membrana íntegra e funcionalmente ativa ocorreu normalmente (CORREA & ZAVOS, 1994).

CONCLUSÃO

A capacidade fecundante do espermatozoide está diretamente relacionada com a qualidade do sêmen. Para realizar uma avaliação da qualidade do sêmen, faz-se necessário a adoção de um protocolo de avaliação seminal rotineira, tais como análises de vigor, motilidade, morfologia espermática e funcionalidade da membrana do espermatozoide, como forma de monitoramento da qualidade seminal dos reprodutores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANJOS, J.E.A.B. Trabalho de conclusão de curso de Medicina Veterinária. Departamento de Medicina Veterinária, Brasília-DF, 2006. Disponível em:

<<http://www.upis.br/pesquisas/tcc/Jos%E9%20Eduardo%20Almeida%20Brito%20dos%20Anjos.pdf>>. Acessado em: 22 de Novembro de 2012.

AMMAN, R.P. & HAMMERSTEDT, R.H. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. **Journal of Andrology**, v. 23, p. 317-325, 1993.

ARRUDA, R.P., BALI, B.A. & GRAVANCE, C.G. LIU, I.K.M. Avaliação dos efeitos diluidores e crioprotetores para espermatozóides de garanhões utilizando análises computadorizadas da motilidade (CASA) e citometria de fluxo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 228-229, 2003.

BARTH, A.D. & OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ed. Ames, Iowa: Iowa State University, press, p. 285, 1989.

BERNARDI, M.L. Technologies used in the assessment of boar ejaculate to produce high quality semen doses. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, p. 5-16, 2008.

BLOOM, E. Interpretation of spermatocytology in bulls. **Fertility and Sterility**, v. 1, p. 233-238, 1950.

BONET, S. Immature and aberrant spermatozoa in the ejaculate of *Sus domesticus*. **Animal Reproduction Science**, v.22, p.67-80, 1990.

BORTOLOZZO, F.P., WENTZ, I. & DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.1, n.33, p. 17-32, 2005.

BRITO, L.F.C., BARTH, A.D., BILODEAU-GOELSELS, S., PANICH, P.L. & KASTELIC, J.P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**, v. 60, p. 1539-1551, 2003.

BUHR, M.M., CURTIS, E.F & NAKUDA, N.S. Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. **Cryobiology**. v.31, p.224-238, 1994.

CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998, 49p.

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

CHACÓN, J. Assessment of sperm morphology in zebu bulls, under field conditions in the tropics. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, p. 91-99, 2001.

CHANDLER, J.E. & ADKINSON, R.W. Genetic and non-genetic contributions to variation in spermatozoal morphology of mature Holstein bulls. In: *Proceeding of the NAAB 13th Technical Conference on AI and Reprod.* p.57-62, 1990.

CHENG, F.P., WU, J.T., CHAN, J.P., WANG, J.S., FUNG, H.P., COLENBRANDER, B. & TUNG, K.C. The effect of different extenders on post-thaw sperm survival, acrosomal integrity and longevity in cryopreserved semen of Formosan Sika deer and Formosan Sambar deer. **Theriogenology**, v. 61, p. 1605-1616, 2004.

COLENBRANDER, B. & KEMP, B. Factors influencing semen quality in pigs. **J Reprod Fertil Suppl**, v.40, p.105-115, 1990.

CORREA, J. R. & ZAVOS, P. M. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. **Theriogenology**, v. 42, p. 351-360, 1994.

CORRÊA, M.N., MEINCKE, W., LUCIA JR. & T. DESCHAMPS, J.C. **Inseminação artificial em suínos**. Copyright. Pelotas, Brasil, 2001.

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.

DE LEEUW, F.E., CHEN, H.C., COLENBRANDER, B. & VERKLEIJ, A.J. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. *Reproduction in Domestic Animals*, Suppl. 1, p.95-104, 1991.

EDDY, E. M. & O'BRIEN, D. A. The spermatozoon. In: knobil, e.; neil, j.d. **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, p. 29-77, 1994.

FLOWERS, W.L. Boar fertility and artificial insemination. In: IPVS Congress, 15, 1998, Birmingham. **Proceedings...** Birmingham: Nottingham University Press, 1998. p.45-52.

FRANÇA, L.R., SILVA, V.A.J.R., CHIARINI-GARCIA, H., GARCIA, S.K. & DEBELJUK, L. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biol Reprod*. 2000;63:1629-1636.

GARCIA, A. R. O uso das sondas fluorescentes na avaliação morfofuncional de espermatozoides bovinos. In: CONGRESSO NORTE/NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL. 3. Belém. **Anais...** Pará: CBRA. 2006. CR-ROM.

GARCÍA, C.P., SALA, E.R., REGUERA, G. & PÉREZ, L. B. Nuevas tecnologías en inseminación artificial porcina. **Avances en Tecnología Porcina**, v. 4, p. 94-100, mar. 2007

GARCÍA, R.J.A., LAPUENTES, S. & CORCUERA, D. Avaliação prática do sêmen. **Suinocultura Industrial**, v. 21, p. 32-35, 1999.

GARNER, D.L. & HAFEZ, E.S.E. Espermatozoides e plasma seminal. In: HAZEZ, E.S.E.;

HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7ed. Manole: São Paulo, 2004. p. 97-110

GARNER, D.L., THOMAS, A.C. & GRAVANCE, C.G. The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 34, p. 399-404, 1999.

GRAHAM, J.K., KUNZE, E. & HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 55-64, 1990.

HALANGK, W., FRANK, K. & BOHNENSACK, R. Determination of the quantity of intact spermatozoa in bull ejaculates. **Archiv Experimentelle Veterinarmedizin**, v. 38, p. 105-114, 1984.

HAMMERSTED, R.H., GRAHAM, J.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.

HANCOCK, J.L.A. Staining technique for the study of temperature-shock in semen, **Nature**, v. 24, p. 323-324, 1951.

HOWARD, T.W. & PACE, M.M. **Seminal evaluations and artificial examination**. In: Fertility and infertility in veterinary practice. 4.ed. London: Bailliere Tindall, 1988. p.39-51.

JEYENDRAN, R.S. & VAN DER VEN, H.H. Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LID. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **J Reprod Fertil**, v.70, p.219-225, 1984.

JOHNSON, L.A. Isolation of X- and Y-bearing sperm for sex preselection. **Biology of Reproduction**, v. 16, p. 303-26, 1994.

JOHNSON, L.A., WEITZE, K.F. & MAXWELL, W.M. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 143-172, 2000.

KANAI, Y., HIRAMATSU, R., MATOBA, S. & KIDOKORO, T. From SRY to SOX9: Mammalian Testis Differentiation. **J Biochem**. 2005;138:13–19.

LANGERLÖF, N. Morphological Studies on the changes in sperm structure and in the testes of bulls with decreased or abolished fertility. **Acta Pathol Microbiol Scand**, v. 19, p.245-266, 1934.

LEIDL, W., STOLLA, R., SCHEFELS, W. & SCHAD, C. **Morphology of sperm**. Description, classification and assessment. Part 2. Boar (*Sus scrofa f. domestica*). Software distributed by Minitube of America, Inc., Version 7. July 1999.

LENZI, A., PICARDO, M. & GANDINI, L. et al. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Human Reproduction Update**, v.2, p.246-256, 1996.

LEVIS, D. Liquid boar semen production: current extender technology and where do we go from here. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION. 4., Beltsville, Maryland USA. **Proceedings...** Lawrence : Allen, 2000. p.121-128.

MANELLA C.A. Introduction: our changing views of mitochondria. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 32, p. 1-4, 2000.

MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v. 3, n. 5, p. 403-439, 1997.

PAL, S.K., MANDAL, D. & BHATTACHARYYA, K. Photophysical process of ethidium bromide in micelles and reverse micelles. **Journal of Physical and Chemical**, v. 102, p. 11017-11023, 1998.

PAPA, F.O., ALVARENGA, M.A., DELL'AQUA, J.A. & MONTEIRO, G.A. **Manual de Andrologia e manipulação de sêmen equino**. 2011. Disponível em: <http://www.botupharma.com.br/andrologia.pdf>. Acessado em: 09 de Dezembro de 2012.

PARKS, J.E. & GRAHAM, J.K. Effect of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, p. 209-222, 1992.

PELLINIEMI, L.J. Ultrastructure of the early ovary and testis in pig embryos. *Am J Anat.* 1975;144: 89-111.

PELTONIEMI, O.A.T., LOVE, R.J., HEINONEN, M., TUOVINEN, V. & SALONIEMI, H. Seasonal and management effects on fertility of the sow: a descriptive study. *Animal Reproduction Science*, v.55, p.47-61, 1999.

PILIP, R., DEL CAMPO, M.R., BARTH, A.D. & MAPLETOFT, R.J. In vitro fertilizing characteristics of bovine spermatozoa with multiple nuclear vacuoles: a case study. **Theriogenology**, v. 46, p. 1-12, 1995.

POTTER, R. Does hot weather cause seasonal infertility in outdoor sows? **The Pig Journal**, v.41, p.110-2, 1998.

RAO, A.R., BANE, A. & GUSTAFSSON, B.K. Changes in the morphology of sperm during their passage through the genital tracts in bulls with normal and impaired spermatogenesis. **Theriogenology**, v. 14, n. 1, p. 1-12, jul. 1980.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. & ERIKSSON, B. Evaluación del semen de verraco y su relación con fertilidad. In: Simpósio Internacional Minitub, 3., 2000. Flores da cunha-RS, p. 13-33.

ROTA, A., PENZO, N. & VINCENTI, L.E. Hypoosmotic swelling (HOST) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v.53, p. 1415-1420, 2000.

SAACKE, R.G. What is a BSE-SFT standards: the relative importance of sperm morphology: an opinion. **Proc Soc Theriogenol**, p. 81-87, 2001.

SAACKE, R.G., DALTON, J.C., NADIR, R.L., NEBEL, J.H. & BAME, J.H. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 663-677, 2000.

SAACKE, R.G., NADIR, R.L. & NEBEL, J.H. Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization, and embryo quality in ruminants. **Theriogenology**, v. 41, p. 45-60, 1990.

SCHEID, I.R., WENTS, I. & KICH, J.D. Toxicidade das luvas de coleta ao sêmen suíno. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 1., Blumenau, 1995. **Anais**. Blumenau : s.c.p., 1995. p.148.

SCHEID, I.R., WENTS, I., SOUZA, N.M. & MARIANO, N.M. Resultados comparativos da inseminação artificial em suínos com sêmen congelado e resfriado. Comunicado Técnico. **EMBRAPA-CNPSA**, Março, 1986, p. 1-2.

SETCHELL, B.P. Spermatogenesis and spermatozoa. In: AUSTIN, C.R.; SHORT, R.V. **Germ Cells and Fertilization**, p. 63-101. 1993.

SUTKEVICIENE, N., RISKEVICIENE, V., JANUSKAUSKAS, A., ZILINSKAS, H. & ANDERSSON, M. Assessment of sperm quality traits in relation to fertility in boar semen. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 51, n. 53, p. 1-6, dec. 2009.

THUNDATHIL, J., PALASZ, A.T., BARTH, A.D. & MAPLETOFT, R.J. Plasma membrane and acrosomal integrity in bovine spermatozoa with the knobbed acrosome defect. **Theriogenology**, v. 58, p. 87-102, 2002.

TONIOLLI, R. Pouvoir fecondant des spermatozoïdes de verrat: amèlioration des conditions de conservation. Université François Rabelais de Tours - France, These de Doctorat, 91p., 1996.

TONIOLLI, R. Morfologia dos espermatozoides de suíno, diluído no diluidor de Beltsville (BTS) adicionados do ácido 3-indol acético. **Ciência Animal**, v.2, n. 9, p. 61-65, 1999.

WILSON, H.R., WARNICK, A.C. & GUTIERREZ, J.H. Differentiation of live from dead spermatozoa in cock semen. *Poultry Science*, v. 48, p. 714-717, 1969.

YANAGIMACHI, R. **Mammalian fertilization**. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. The Physiology of Reproduction. Raven Press: New York, p. 189-317, 1994.

ZAMBONI, L. Sperm structure and its relevance to infertility. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 116, n. 4, p. 325-344, apr. 1992.

7 CAPÍTULO II

Sperm quality during the cooling curve and use of ACP-103[®] diluent on cryopreservation of boar semen

Daianny Barboza Guimarães; Tatyane Bandeira Barros; Ludymila Furtado Cantanhêde; Aline Viana Dias; Lina Raquel Santos Araújo; Eduardo Nunes de Freitas; Leonardo Peres de Sousa; Jean Magloire Nguekam Feugang; Ricardo Toniolli.

Periódico: Anais da Academia

Submetido em: 07 de Novembro de 2013
Brasileira de Ciências

**Sperm quality during the cooling curve and use of ACP-103[®] diluent on
cryopreservation of boar semen**

Daianny Barboza Guimarães¹; Tatyane Bandeira Barros¹; Ludymila Furtado
Cantanhêde¹; Aline Viana Dias¹; Lina Raquel Santos Araújo¹; Eduardo Nunes de
Freitas³; Leonardo Peres de Sousa³; Jean Magloire Nguekam Feugang²; Ricardo
Toniolli³

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – FAVET/UECE;

²Department of Animal and Dairy Sciences, Mississippi State University;

³Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen – FAVET/UECE. Av. Paranjana, 1700.

Campus Itaperi, Fortaleza, Ceará, Brasil.

CEP: 60.740-000.

Keywords: coconut water powder, cooling curve; sperm viability.

OPTIMIZATION OF SWINE SPERM CRYOPRESERVATION

Daianny Barboza Guimarães.

Rua 37, 1296. Barra do Ceará, Fortaleza, Ceará.

Telefone: (85) 9802 2228/(85) 9694 6055.

email: daiannybg@yahoo.com.br

2 ABSTRACT

Semen cryopreservation is associated with low productivity results. This study aimed to test the Coconut Water Powder (ACP[®] -103) as a resuspension diluent after thawing semen, also evaluate sperm quality during the cooling curve until thawing of the semen. For this, the semen was collected from fifteen boars once a week, incubated at 30 °C for fifteen minutes, and afterwards, the samples were diluted in the diluent Beltsville Thawing Solution (Control) or ACP-103[®], and subjected to a slow cooling curve, where the force and the motility were analyzed in each step. The thawed semen was resuspended in its respective solvents and analyzed in the characteristics of vigor, motility, vitality, acrosome integrity and functionality of the membrane. During the analysis of vigor and motility that make up the cooling curve, and thawing, for analysis of vitality and intact acrosomal membrane, it was observed that there was no significant difference between treatments. Besides, after thawing, the BTS showed better results of sperm vigor, sperm motility and membrane functionality. However, the cooling curve and coconut water powder can be used in the protocol for cryopreservation of boar semen, as both ensured quality of sperm viability that may be used in artificial insemination.

Keywords: coconut water powder, cooling curve; sperm viability.

3 INTRODUCTION

Cryopreservation of boar semen provides ejaculated storage of high value animals indefinitely, thus maximizing the reproductive power of the male, allowing its use even after the death of the animal. Also, it allows the reduction of breeding costs maintenance, since frozen semen can be purchased with quality proven (Castelo et al., 2008).

Studies conducted over the past three decades on semen cryopreservation resulted in advances in terms of different cryoprotectants, packaging, diluents and freezing curves (Antunes, 2007). However, the use of frozen semen in swine reproductive still presents unsatisfactory rates, and it is associated with birth rate and the number of piglets per litter reduced (Johnson, 1998).

The decrease in sperm viability after thawing is a very common feature in swine due to thermal and osmotic stress imposed on sperm cells, especially on its plasma membrane. If the freezing is slow, there is damage due to excessive dehydration of the cell, if it is too fast, the sperm do not lose enough water, which causes the formation of ice crystals in the cytoplasm, causing irreversible damage such as breakage of the membrane sperm. Then, the freezing rate should be sufficiently slow to permit water outflow from the cell by osmosis, preventing intracellular ice crystals, and quickly enough to minimize the damage by prolonged exposure to high concentrations of solutes (Escobar, 2004).

For semen to be maintained, it must be diluted properly, seeking a greater durability and transportation. The diluent protects the sperm membrane against thermal shock and to mechanical injuries caused by transport, also, providing nutrients and stabilize the pH of the medium (Verstegen et al., 2005).

Nowadays, diluents offer good protection to the sperm integrity in cooling protocols. However, low fertility of the semen may be related to the composition of diluents, which have no substances capable to maintaining the sperm integrity during large temperature reductions. Also, low fertility may allow changes in the characteristics of covering components of the sperm membrane, resulting in a destabilization caused by permeability and free entry of calcium into the cell, which in turn stimulates the early training process (Smith, 2007).

From the above, it is evident the need to optimize freezing protocol in order to obtain a better viability of the sperm after thawing. Thus, this study aimed to develop a new cooling curve of temperature and test the ACP - 103[®] as a diluent alternate protocols freezing boar semen.

4 MATERIALS E METHODS

4.1 Animals, collection and evaluation of fresh semen

This study was approved by the Ethics Committee of the State University of Ceará, on January 25th of 2012, in 11518234-9/72 process. The animals used for the study were from the Laboratory of Swine Breeding and Semen Technology, Faculty of Veterinary Medicine, State University of Ceará and the Poultry/Piggery Farm Xerez LTDA, at the City of Maranguape, Ceará. Animals were used between 12 and 24 months in routine work system.

A total of 15 breeders were submitted to semen collection once a week. The semen collection (ejaculate total) was performed by the gloved hand in a container with a capacity of 500 mL, covered with a gauze wrap and protected by heat. After collection, the semen was taken to the laboratory for processing. The gelatinous fraction, retained by the gauze, was despised and the ejaculate evaluated.

The evaluation was made by the following characteristics: volume (mL), measured on a digital scale; concentration ($\times 10^6$ sperm / mL), measured in a spectrophotometer, and total sperm ($\times 10^9$ spz). The spermativigor (0-5 - Toniolli, 1996) and sperm motility (0-100%) were evaluated by light microscopy, a semen sample (15 μ L) placed between slide and cover slip and taken under the microscope in an increase of 200 times. These tests were used for the evaluation and control of semen from each ejaculate during the experimental period, withdrawing a total of 2.5×10^9

sperm / ejaculate, being used only those with values ≥ 3.5 minimum force and motility ≥ 85 %.

4.2 Experimental treatments

For the present study, two treatments were used, each corresponding to a diluent semen. The Beltsville Thawing Solution (BTS) as a treatment control and Coconut Water Powder (ACP-103[®]), which is the treatment to be tested as an alternative diluent for cryopreservation of swine ejaculated.

4.3 Protocol of semen freezing

After evaluation, the semen was divided equally between two 50 mL tubes, wherein each tube corresponded to a treatment, then, submitted to a cooling curve described below.

Initially, the semen was incubated for 15 minutes at 30 °C and diluted (dilution 1 - 3vol: 1vol) in the BTS or ACP-103[®] (24g coconut water powder in 100 ml of distilled water, with 80 mg of antibiotic gentamicin). After dilution, the semen was kept at this temperature for 45 minutes more.

The diluted semen was cooled to 25 °C for 30 minutes. Then, the tubes were transferred to the dark for 2 hours at 17 °C. Subsequently, the tubes were centrifuged at 800G/15 min. 5 °C.

After centrifugation, the semen was transferred to a refrigerator at 5 °C, where the supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in cooling diluent (dilution 2 - 20% egg yolk and 34.23 g glucose) at an initial concentration of 6×10^9 cells/mL. After resuspension, semen was kept at 5 °C for another 60 minutes (slow cooling). At the end of this time, the freezing diluent was added (dilution 3 - volume to

volume) with the same composition of cooling the diluent plus 6% glycerol (2ml: 2ml), with a final concentration of 100×10^6 cells / mL.

The semen was packaged in plastic straws 0.5 ml and sealed with polyvinyl alcohol powder. After packaging, the straws were placed on a freezing ramp (-60 to -70 °C) to 5 cm above liquid nitrogen for 30 minutes, then, submerged in liquid nitrogen (-196 °C).

4.4 Quick thawing and semen resuspension

For thawing of the semen, the pellet was placed in a water bath at a temperature of 39 °C for 50 seconds. After thawing, the contents of each pellet was resuspended on each diluent tested (BTS and ACP-103[®]), which were at the same temperature. For in vitro tests, semen dilution in resuspended diluents was carried out with regarding to the concentration of an insemination dose. Therefore, we used 0.5 ml of the diluted semen in 2 ml of resuspended diluent. The samples were placed in test tubes and kept in water bath at 39 °C during the whole period of the semen analysis.

4.5 Parameters and moments of semen evaluation

4.5.1 Spermatic vigor and sperm motility

For the characteristics spermatic vigor (0-5 - Toniolli, 1996) and sperm motility (0-100%), three different microscope fields were evaluated in, repeating the analyzes in six times during the cooling curve: Analysis 1 (A1) = made immediately after dilution (dilution 1) of the ejaculate to 30 °C; Analysis 2 (A2) = made after the 45 minutes of dilution, also at 30 °C; Analysis 3 (A3) = done after 30 minutes at 25 °C; analysis 4 (A4) = done after two hours in the dark phase at 17 °C; analysis 5 (A5) =

after cooling diluent be added (dilution 2) to 5 °C; analysis 6 (A6) = taken after the freezing diluent be added (dilution 3), also at 5 °C (Figure 1).

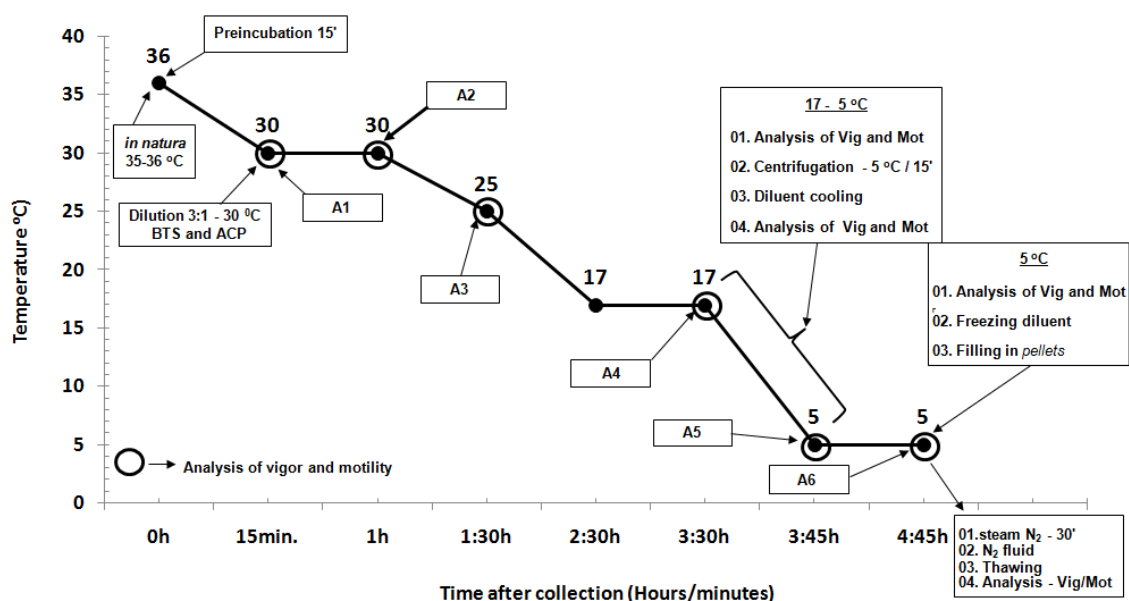


Figure 1: Cooling curve with their respective analysis of spermatic vigor and motility in the freezing and thawing of boar semen.

From the analysis 1-4, a semen aliquot was removed (15 µL), and from analysis 5e 6, a semen aliquot was removed (15 µL) and diluted (3:1) in their respective diluents. The aliquots were heated for 2 minutes at 30 °C, and placed between slide and cover slip to be analyzed in light optical microscopy at 200X magnification. A final analysis of spermatic vigor and motility was performed after thawing, and the semen bottle was submerged at 39 °C for 50 seconds, after that, 2mL BTS were diluted for treatment, and 2 mL of ACP for treatment 2. Immediately after dilution, a semen aliquot was removed (15 µL) from resuspended semen, placed between slide and cover slip, and examined in the light optical microscopy at 200x magnification.

4.5.2 Morphological evaluation and sperm vitality

These tests were performed after thawing, evaluating the acrosomal integrity and sperm vitality (% live cells), both measured in percent. For this test, a rate of thawed semen was used (15 μ L) and a dye (15 μ L) and made the smear, which was analyzed in a total of 200 cells by microscopy light with immersion lens at 1000x magnification. The dye used was blue bromo-phenol (0.1 g bluebromo-phenol, 0.4 g sodium citrate and 100 mL of distilled water, 300 to 310 mOsm). According to acrosome morphology and vitality, the sperm was classified into four categories: 01. Alive with intact acrosome; 02. Living with damaged acrosome; 03. Dead with intact acrosome; 04. Dead with damaged acrosome.

4.5.3 Osmotic resistance test (ORT)

This test allows the evaluation of the functionality of the sperm membrane, and it was performed after thawing. For this, it was put into a test tube 0.5 mL of diluted semen added with 7.5 mL of distilled water, and maintained for 15 minutes at 39 °C (solution A). Subsequently, 1 mL was removed from the solution and placed in another test tube containing 0.5 mL of 1% formalin saline solution (B). Then, it was withdrawn 15 μ L of Solution B and placed between slide and cover slip. 200 sperm/smears were evaluated, and the proportion of sperm with curled tail and tail straight was done, using the phase contrast 1000x magnification.

4.6 Statistical analysis

The experimental delineation was a randomized block. The statistical analysis was made by evaluating the means and standard deviations, which were applied the Mann-Whitney and Student t test. For comparison of multiple means was used ANOVA, with Tukey as a post-test. Once data with different variance was observed by

Bartlett's test, we used the KruskalWallys with Dunns post-test. All tests were performed with a significance level of 0.05.

5 RESULTS AND DISCUSSION

The fresh semen of 75 ejaculates obtained in this study had normal appearance and color milky white, average volume of 249.4 mL and an average concentration of 319.1×10^6 sperm / mL. Such characteristics are within the normal range for swine (Corrêa et al., 2001). Microscopic evaluation showed the same average value for the spermativigor 4.2 ± 0.3 , and to sperm motility of 89.4 ± 4.9 . These values remained above the stipulated minimum parameters to be used in the experiment (force ≥ 3.5 and $\geq 85\%$ motility).

Effect of new cooling curve on the sperm cell

To assess the effect of the cooling curve, the spermativigor and sperm motility were analyzed, at pre-determined. Both traits showed a decline of values, due to the decline in temperature and consequent reduction in sperm metabolism, accompanied by the reduction of the mechanical activity of the cell, because during incubation periods, the sperm gradually consume the nutrients available in the diluent, and excrete toxic as free radicals, resulting from its metabolism (Correa et al. 2001).

The production of free radicals during incubation also contributes to the decrease in sperm survival, since that in aerobic or partially anaerobic environment to produce reactive oxygen species (ROS) is inevitable (Viswanath and Shannon, 1997). However, even under these circumstances that occur during the decreasing temperature, which can affect sperm motility, the cooling curve used in this study showed good results and similar to Westendorf evaluated in previous studies. (Bianchi et al., 2011).

Powdered coconut water as a diluent alternative for cryopreservation

Comparing the results between the different treatments (BTS and ACP) during the cooling curve (A1 to A6), the two diluents behaved similarly, showing no significant difference ($p > 0.05$) during the duration of temperature lowering, before freezing (Table 1). The same result was seen in recent studies, where these diluents also showed no significant differences for the spermatic vigor and sperm motility, during storage of boar semen at temperatures of 17 and 10 ° C (Araújo, 2012). Thus, it shows that the ACP, as a diluent alternative, can replace the commercial diluent BTS, which is widely used in artificial insemination protocols for swine, serving as a simple option, cheap and easy to obtain without compromising quality sperm and fertility results.

Table 1: Comparative analysis of spermatic vigor during cooling in boar semen stored in BTS diluents and ACP-103 ®, seeking to freezing.

Vigor	A1	A2	A3	A4	A5	A6
BTS	3,2±0,7 ^A	3,0±0,7 ^A	2,8±0,7 ^A	2,4±0,6 ^A	3,1±0,5 ^A	2,7±0,7 ^A
ACP	3,3±0,7 ^A	3,0±0,6 ^A	2,9±0,6 ^A	2,5±0,5 ^A	3,0±0,5 ^A	2,7±0,7 ^A

A, B, C, different letters in the same column, significant differences ($p < 0.05$).

As can be seen in the charts below, the BTS and ACP treatments (Figure 1) showed a similar behavior for the analysis of spermatic vigor, throughout the period of temperature decreasing. From the results of the first (A1) the fourth analysis (A4), there was a decline in spermatic vigor, which were expected in both treatments due to temperature reduction.

However, the results acquired on analysis fourth (A4) found the lowest mean both in the BTS (2.4 ± 0.6) as in the ACP (2.5 ± 0.5), and significant difference (p

<0.05) when compared with the other analyzes. This result may be related to the fact that this time, the semen went through a long period of equilibrium at a very low temperature (2 h at 17 ° C), providing a greater reduction of cellular metabolism.

According to Watson (2000), the semen cooling that occurs during the equilibration time contributes to the reduction of sperm metabolism, but if this decrease occurs abruptly, can produce seminal loss of viability. Therefore, the equilibrium time of 2 hours at 17 ° C that was used in this study, had the lowest mean in both diluents, because this period resulted in a further reduction in sperm metabolism.

Following the protocol (A5), there is an increase in the average in both treatments, where these were not significantly different ($p > 0.05$) with A1. Such an event may be related centrifugation of sperm cells which acts as a training cell induced by removal of the seminal plasma and hence an increase in the spermatoc. Finally, the analysis performed before freezing (A6), both diluents showed again a decline in sperm vigor, but showed no significant difference ($p < 0.05$) with the A5, showing that sperm cells were frozen with one spermatoc good quality.

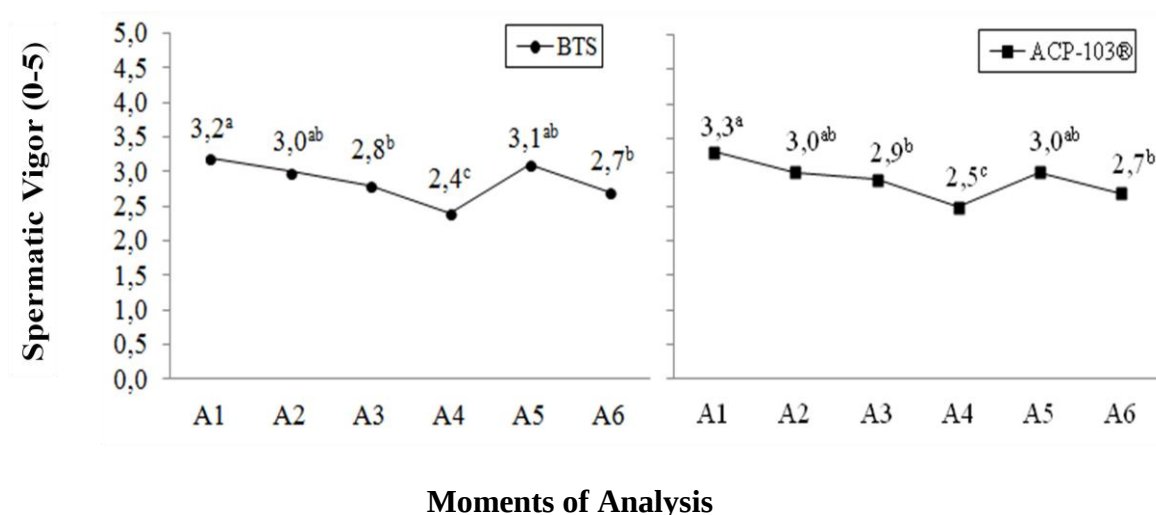


Figure 2: Analysis of variance of the spermatoc during the cooling curve of boar semen preserved in BTS and ACP-103®.

A1 = dil.1, 30 °C; A2 = 1h, 30 °C; A3 = 25 °C; A4 = 2h, 17 °C;

A5 = centrifugation, dil.2 / 5 °C; A6 = dil.3 / 5 °C)

As can be seen in Table 2 sperm motility was also examined at six different times during the decreasing temperature of the semen and like the spermatic vigor, it did not show statistically significant differences ($p > 0.05$) between the results of the six analysis (A1 to A6), that in both diluents.

Table 2: Comparative analysis of sperm motility (%) during cooling in boar semen stored in BTS and ACP-103 ® diluents, seeking to freezing.

	A1	A2	A3	A4	A5	A6
BTS	75,5±16,6 ^A	68,9±18,7 ^A	65,4±19 ^A	54,4±19,3 ^A	64,0±14,8 ^A	57,6±19,4 ^A
ACP	75,0±17,7 ^A	71,8±15,7 ^A	68,7±17,4 ^A	56,5±16,7 ^A	62,5±12,7 ^A	55,8±16,5 ^A

A,B,C, different letters in the same column, significant differences ($p < 0,05$).

Regarding the effect of the curve, the BTS and the ACP (Figure 2) showed behavior distinct from each other, because the ACP showed a lower variability between the results of the analyzes on the curve, unlike the BTS showed significant difference in almost all analyzes compared between itself.

As can be seen in Figure 2, the results of the first four points analyzed (A1 to A4) had a reduction in sperm motility in both treatments, thus, this natural drop can be explained by changes in pH and osmolarity of the medium, since with the course of time, there is the energy consumption of the substrate and the production of metabolites (Fontenele et al. 2002).

Already in the next assessment (A5), there was an increase in the sperm motility average in both treatments. This result may be related to the fact that, to perform this analysis, the semen suffered a centrifuge where seminal plasma was removed. Studies have reported that the presence of seminal plasma provides greater sensitivity to thermal shock on pig sperm (Dalimata and Graham, 1997), because it contains factors that modify the sperm cells before freezing (Kawano et al. 2004).

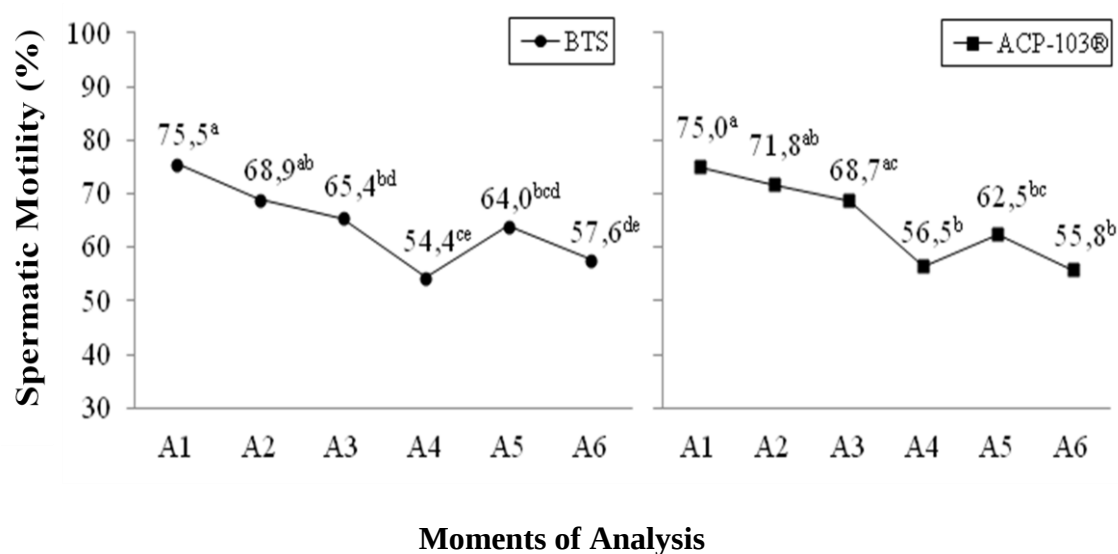


Figure 3: Variance analysis of sperm motility during cooling curve of boar semen, preserved in BTS and ACP-103 ®.

A1 = diluição 1, 30 °C; A2 = 1h, 30 °C; A3 = 25 °C; A4 = 2h, 17 °C;

A5 = centrifugação, diluição 2, 5 °C; A6 = diluição 3, 5 °C;

Finally, the sperm cells were frozen having a spermatic vigor and quality of sperm motility can be observed, even after the sperm being subjected to the stress of temperature reduction. Such results may be related to the cooling curve used for the time of temperature reduction must be sufficiently slow to minimize the formation of intracellular ice crystals and fast enough to make minimum the damage "solution effect" (Watson, 1995 .)

Thus, a good cooling rate should allow the sperm cells to lose water but not excessively, allowing small crystals can be formed, but they are not detrimental to cause cell death (Graham, 1995).

Diluent effect after thawing

After thawing (Table 3), BTS showed better results ($p < 0.05$) for the spermatic vigor (1.8 ± 0.9) and motility (31.4 ± 22.4) characteristics compared with those obtained by ACP diluent (1.5 ± 0.9 and 21.3 ± 18.3 , respectively).

In recent studies in which the coconut powder were used as diluent preservation of boar semen, also, results with reduced sperm quality were seen, both for the spermatic vigor and for motility in different ejaculates (Barros, 2010). However, the semen had not been subjected to seminal cryopreservation, and still showed inferior results compared to the results of this study.

However, comparing this study with studies that used the coconut powder in semen cryopreservation from other species, the results of sperm motility after thawing for swine (21.3%) were lower compared with the results obtained in sheep, 40.3% (Cavalcante, 2008), and in canines, 58.4% (Mota-Filho et al., 2011). These results can be justified by the fact that the pig sperm is the most sensitive to temperature fluctuations, being considered among mammalian species (Corrêa et al., 2001).

Nevertheless, the semen was frozen with good quality, with a mean of 2.7 ± 0.7 for the spermatic vigor, in both diluents, and for the motility average of 57.6 ± 19.4 and 55 in the BTS, 8 ± 16.5 in ACP. Meanwhile, these results greatly reduced after thawing, which was expected, because the significant decline in the percentage of motile spermatozoa during incubation may be due to the inability of sperm cryopreserved to generate enough adenosine triphosphate (ATP) by mitochondria, as a

result of damage suffered by these organelles (Viswanath and Shannon, 1997) or due to the damaging effect of the enzyme aromatic amino acid oxidase linked to the plasma membrane and released by dead spermatozoa (Curson and Shannon, 1972).

Therefore it is necessary to develop strategies, such as using a slow cooling curve, cryoprotectants and diluents, such as were used in this study, in order to prevent cell damage.

Table 3: Analysis of spermatic vigor and motility of boar semen analyzed after thawing.

Analysis of thawing	BTS	ACP-103 [®]
Spermatic Vigor	1,8±0,9 ^A	1,5±0,9 ^B
Sperm Motility	31,4±22,4 ^A	21,3±18,3 ^B

A, B, C, different letters on the same line significant differences (p<0.05)

Regarding the characteristics: total sperm alive, total membrane intact acrosome and total live cells with intact acrosome membrane, BTS and ACP showed similar results, with no significant difference (p> 0.05) between diluents for these three characteristics evaluated (Table 4).

However, as seen in Table 4, the percentage of live cells with intact acrosome showed low values in both the diluents after thawing. These low results obtained in this study show that semen cryopreservation is a biotechnique that provides a high number of spermatozoa with reacted acrosomes (Peris et al., 2004), which may occur due to temperature variations (Stornelli et al. 2005) or due to increased intracellular Ca²⁺ concentration generated during the process of semen (Sanocka and Kurpisz, 2004).

Although capacitation is a physiological process, it can occur early in sperm that have undergone the process of freeze / thaw (Mortimer and Maxwell, 2004), reducing or ending the power of fertilization of gametes (Gadella and Silva, 2006).

Tabela 4: Total de espermatozoides vivos (%), com acrossoma intacto e vivos com acrossoma intacto do sêmen suíno analisado no pós-descongelamento.

	BTS	ACP-103[®]
Total espermatozoides vivos	41,1±19,9 ^A	40,5±16,3 ^A
Total de Acrossoma intacto	84,8±20,6 ^A	86,3±16,3 ^A
Sptz vivos com acrossoma intacto	37,1±15 ^A	36,9±13 ^A

A, B, C, different letters on the same line significant differences (p <0.05).

As can be seen in Table 5, in evaluating the functionality of the membrane of the sperm, which is given by the percentage of reactive cells to osmotic stress test, the diluents tested showed significant differences (p> 0.05) where the BTS (28.4%) had a higher percentage of functional membranes than the ACP (24.2%).

The fact that more than 70% of sperm cells do not show functional membranes, due to the cryopreservation action to induce physical damage to cells (Holt, 2000), because this process leads to greater cellular stress and imposes sperm extremely unfavorable conditions for maintaining its viability (Purdy, 2006).

For cryopreservation, the plasma membrane suffers modifications to suit the temperature changes, as the movement of phospholipid translocation with externalization of phosphatidylserine. These changes occurred in the sperm membranes during the process of freeze / thaw similar to those physiological changes of capacitation (Silva et al., 2009).

Thus, plasma membrane integrity seems to be the parameter most affected by sperm cryopreservation (Avila-Portillo et al., 2006; Arruda et al., 2007). This is because the temperature changes subject to the membranes, stresses arising from the phase transition structure of the liquid crystalline to the gel (Canisso et al., 2008), altering its function (Watson, 2000). As a result, damage occurs to the acrosomal and mitochondrial membranes (Quinn et al. 1980), as well as premature acrosome reaction (Leboeuf et al. 2000).

This leads the sperm with damaged plasma membranes to be considered incapable of performing the fertilization process (Silva and Gadella, 2006), since only spermatozoa with intact membranes can suffer capacitation and acrosome reaction (Pesch and Bergmann, 2006).

In cryopreserved semen, the number of damage observed in sperm cells is significantly higher compared to fresh semen, and this fact does not depend on the techniques used for cryopreservation (Ortega et al., 2003), nor the species worked. These lesions observed in sperm cells arise from the interaction between changes biophysical, biochemical and environmental changes during the freezing process (Fickel et al., 2007), submitting the cryopreserved cells to stresses resulting from volume changes and consequent changes in the concentrations of ions and electrolytes in the intracellular and extracellular solutions (Stornelli et al. 2005).

Meanwhile, the thawing is the reverse of the changes caused by the cooling and freezing processes being observed during this step, the decrease in intracellular concentration of the solute concentration and the restoration of cell volume and water (Holt et al. 1992).

While the freezing is linked to restore cellular characteristics, this can cause lipid peroxidation and membrane damage, caused by rapid increase in the use of oxygen

by the sperm (Guerra et al., 2004), as well as membrane rupture due to excessive water flow into the cell (Holt, 2000). Thus, it is expected that the assessment of membrane functionality present unsatisfactory results.

Table 5: Total sperm reactive osmotic resistance test (%) of boar semen analyzed after thawing.

	BTS	ACP-103 [®]
Membranefunctionality	28,4±8,8 ^A	24,2±7,6 ^B

A, B, C, different letters on the same line significant differences (p <0.05).

To obtain best results in cryopreservation of boar semen, a search is necessary to optimize the protocol in order to minimize the cell damage caused by freezing. Schober et al. (2007) comment that mitochondrial damage during cryopreservation may be the biggest reason for reduced semen quality after thawing.

Regarding to the cooling curve, it has adopted the slow freezing process, maintaining the viability of sperm to semen freezing. However, the optimal rate of cooling, freezing and thawing may vary according to the composition of diluent (Salamon and Maxwell, 1995). Thus, more studies are necessary using the diluent ACP-103 in cryopreservation of boar semen for the best results.

However, it can be seen in the present study that although the BTS has shown better results than the ACP to the characteristics of strength and motility after thawing, but also has shown better results for reactive membrane osmotic resistance test, ACP still showed acceptable results for artificial insemination for swine. For the second and Maxwell Salamon (2000), only 20-30% of biologically spermatozoa remain undamaged after the process of freezing and thawing.

Thus, the coconut powder can be used as a diluent for cryopreservation of pig semen, since that it maintains the viability of sperm form which may be used in artificial insemination, and provide easy handling and low cost. As the cooling curve, the sperm viability assured throughout the reduction process temperature, which can then be used in future protocols.

6 RESUMO

A criopreservação seminal apresenta baixos resultados produtivos. Este trabalho teve como objetivo testar a Água de Coco em Pó (ACP-103[®]) como diluente de resuspensão após a descongelação seminal e avaliar a qualidade espermática durante a curva de resfriamento até a descongelação do sêmen. Para isso, o sêmen de quinze reprodutores foi coletado uma vez por semana, incubado a 30 °C por quinze minutos, e em seguida diluído em Beltsville Thawing Solution (Controle) ou em ACP-103[®], e submetidos a uma curva de resfriamento lenta, onde foram feitas análises de vigor e motilidade em cada passo. O sêmen descongelado foi resuspendido em seus respectivos diluentes e analisado quanto as características: vigor, motilidade, vitalidade, integridade acrossomal e funcionabilidade da membrana. Durante as análises de vigor e motilidade que compõem a curva de resfriamento, e na descongelação, para as análises de vitalidade e membrana acrossomal intacta, observou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos. Já após a descongelação, o BTS apresentou melhores resultados de vigor, motilidade espermática e funcionabilidade da membrana. No entanto, a curva de resfriamento e o ACP-103[®] podem ser utilizadas no protocolo de criopreservação do sêmen suíno, visto que ambas asseguraram qualidade da viabilidade espermática.

Palavras-chave: Água de coco em pó; curva de resfriamento; viabilidade espermática.

7 REFERENCES

ANTUNES RC. 2007. Avanço tecnológico e aplicabilidade da técnica de congelamento de sêmen suíno. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.31, n.1, p.60-63.

ARAÚJO LRS. 2012. Uso de diluentes alternativos a baixas temperaturas na manutenção da qualidade espermática do sêmen suíno. 92f. Fortaleza, CE. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Estadual do Ceará, 2012. Disponível em: <<http://www.uece.br/ppgcv/dmdocuments/linaraquel.pdf>>. Acesso em: 05 de Setembro de 2013.

ARRUDA RP, ANDRADE AFC, PERES KR, RAPHAEL CF, NASCIMENTO J E CELEGHINI ECC. 2007. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.31, p.8-16.

ÁVILA-PORTILLO LM, MADERO JI, LÓPEZ C, LEÓN MF, ACOSTA L, GÓMEZ, C, DELGADO LG, GÓMEZ C, LOZANO JM E REGUERO MT. 2006. Fundamentos de criopreservación. *Rev Colomb Obst Ginecol*, v.57, p.291-300.

BARROS TB. 2010. Qualidade espermática do sêmen suíno conservado a baixas temperaturas em diluentes alternativos. 66f. Fortaleza, CE. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Estadual do Ceará, 2010. Disponível em: <http://www.uece.br/ppgcv/dmdocuments/tatyane_barros.pdf>. Acesso em: 05 de Setembro de 2013.

BIANCHI I, MIRAPALHETA MADEIRA EM, SCHNEIDER A, RABASSA VR, CORRÊA EK, LUCIA JUNIOR T E CORRÊA MN. 2011. Efeito de diferentes métodos de congelamento, diluentes e tempos de resfriamento sobre a qualidade do sêmen suíno criopreservado. *Acta Sci Vet.* 39(1): 949.

CANISSO IF, SOUZA FA, ESCOBAR JMO, CARVALHO GR, MOREL MCD, SILVA EC, GUIMARÃES JD E LIMA AL. 2008. Congelamiento de semen de burro (*Equus asinus*). *Rev Investig Vet Perú*, v.19, p.113-125.

CORRÊA MN, MEINCKE W, LUCIA JRT E DESCHAMPS JC. 2001. Inseminação artificial em suínos. Pelotas: Printpar Gráfica e Editora.

CASTELO TS, SILVA AR E FROTA TR. 2008. Considerations on goat semen cryopreservation. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.2, n.3, p.67-75.

CAVALCANTE JM. 2008. Avaliação do sêmen ovino diluído e congelado em meio à base de água de coco em pó (ACP-102c) ou Tris. 2008. 89p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará. Ceará.

DALIMATA AM E GRAHAM JK. 1997. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methylcellulose. *Theriogenology*. 58(6): 1065-1079.

ESCOBAR CJ. 2004. Inseminación artificial em caninos. In: GOBELLO, C. (Ed.). Temas de reproducción de caninos y felinos por autores latinoamericanos. Argentina: Latina.

FICKEL J, WAGENER A E LUDWIG A. 2007. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. *Eur J Wildl Res*, v.53, p.81-89.

FONTENELE OS, CARDOSO JFS, CARDOSO RCS, SILVA AR, UCHOA DC E SILVA LDM. 2002. Conservação a 5 °C do sêmen canino diluído em água de coco. In: Simpósio Cearense de Ciência Animal, 4, 2002, Fortaleza; Simpósio Nordeste de Buiatria, 2, 2002, Fortaleza. Anais... Fortaleza: SCCA, 2002. CD-ROM

GRAHAM JK. 1995. Response of spermatozoa to freezing. In: Techniques for handling and utilization of transported cooled and frozen equine spermatozoa. Proceedings...Equine Sciences. Colorado State University - Fort Collins, Colorado. USA. p.83-95.

GUERRA MMP, EVANS G E MAXWELL WMC. 2004. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.28, p.187-195.

HOLT W. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 2-22.

HOLT W, HEAD MF E NORTH RD. 1992. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. *Biol Reprod*, v.46, p.1086-1094.

JOHNSON LA. 1998. Current developments in swine semen: preservation, artificial insemination and sperm sexing. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 15., 1998, Birmingham, England. Anais... Birmingham: Sociedade. p.225-229.

KAWANO N, SHIMADA M E TERADA T. 2004. Motility and penetration competence of frozen-thawed miniature pig spermatozoa are substantially altered by exposure to seminal plasma before freezing. *Theriogenology*. 61(2): 351-364.

LEBOEUF B, RESTALL B E SALAMON, S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.113-141.

MORTIMER ST E MAXWELL WMC. 2004. Effects of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction*, v.127, p.285-291.

MOTA-FILHO AC, TELES CHA, JUCÁ RP, CARDOSO JFS, UCHOA DC, CAMPELLO CC, SILVA AR E SILVA LDM. 2011. Dimethylformamide as a cryoprotectant for canine semen diluted and frozen in ACP-106C. *Theriogenology*, v.76. p.1367-1372.

ORTEGA AM, IZQUIERDO AC, GÓMEZ JJH, OLIVARES-CORICHI IM, TORRES VMM E MÉNDEZ JJV. 2003. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. *Interciencia*, v.28, p.699-704.

- PERIS SI, MORRIER A, DUFOUR M E BAILEY JL. 2004. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. *J Androl*, v.25, p.224-233.
- PESCH S E BERGMANN M. 2006. Struture of mammalian spermatozoa in respect to viability and cryopreservation. *Micron*, v.37. p.597-612.
- PURDY PH. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rumin Res*, v.63, p.215-225.
- QUINN PJ, CHOW PYW E WHITE IG. 1980. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J Reprod Fertil*, v.60, p.403-407.
- SALAMON S E MAXWELL WMC. 2000. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.77-111.
- SALAMON S E MAXWELL WMC. 1995. Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci*, v. 37, p.185-249.
- SANOCKA D E KURPISZ M. 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol*, v.2, p.12-18.
- SCHOBER D, AURICH C, NOHL H E GILLE L. 2007. Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. *Theriogenology*. 68, 745-754.
- SHANNON P E CURSON B. 1972. Toxic effect and action of dead sperm on diluted bovine semen. *J. Dairy Sci*. 55, 615-620.
- SILVA AR, FONTENELE-NETO JD, CARDOSO RCS, SILVA LDM, CHINIRÉA VH E LOPES MD. 2009. Description of ultrastructural damages in frozen-thawed canine spermatozoa. *Ciênc Anim Bras*, v.10, p.595-601.
- SILVA PFN E GADELLA BM. 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, v.65, p.958-978.
- SILVA TASN. 2007 Efeito do plasma seminal na descongelção do sêmen ovino avaliado in vitro e na inseminação artificial cervical. 2007. 64p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade de Brasília. Brasília.
- STORNELLI MC, TITTARELLI CM, SAVIGNONE CA E STORNELLI M.A. 2005. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta Veterinaria*, v. 25, n. 2, p. 28-35..
- TONIOLLI R. 1996. Pouvoir fecondant des spermatozoïdes de verrat: amèlioration des conditions de conservation. Université François Rabelais de Tours - France, These de Doctorat. p.91.

VERSTEGEN JP, ONCLIN K E IGUER-OUADA M. 2005. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris–glucose extender: in vitro and in vivo studies. *Theriogenology*, v.64, p.720-733.

VISHWANATH R E SHANNON P. 1997. Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. *Reprod. Fert. Develop.* 9, 321-331.

WATSON PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, v.60, p.481-492.

WATSON PF. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*, v.7, p.871-891.

8 CAPÍTULO III

Associação de proteínas espermáticas com a qualidade da criopreservação do sêmen suíno

Association of protein with the quality of cryopreservation sperm of boar semen

Daianny Barboza Guimarães; Tatyane Bandeira Barros; Maurício Fraga van Tilburg;
Jorge André Matias Martins; Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura; Ricardo
Toniolli.

**Associação de proteínas espermáticas com a qualidade da criopreservação do
sêmen suíno**

Association of protein with the quality of cryopreservation sperm of boar semen

Daianny Barboza Guimarães¹; Tatyane Bandeira Barros¹; Maurício Fraga van Tilburg²;
Jorge André Matias Martins²; Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura²;
Ricardo Toniolli³.

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – FAVET/UECE.

²Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará – UFC.

³Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen – FAVET/UECE.
Av. Paranjana, 1700. Campus Itaperi, Fortaleza, Ceará, Brasil. CEP: 60.740-000.
E-mail: toniolli@roadnet.com.br

RESUMO

A busca por marcadores de congelabilidade tem como finalidade prever o comportamento dos espermatozoides ao processo de congelamento. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o mapa eletroforético das proteínas da membrana plasmática do espermatozoide suíno e correlacioná-las com a proteção espermática ao processo de criopreservação do sêmen. Para isso, o sêmen de quatorze reprodutores foram submetidos à congelamento lento e descongelamento rápido. Após a descongelamento foram feitas análises de vigor e motilidade espermática, e a partir destes resultados, os animais foram separados em dois grupos: congelabilidade boa e ruim. Para o estudo das proteínas da membrana dos espermatozoides, estes foram submetidos à eletroforese bidimensional. Os géis foram corados com Coomassie coloidal, digitalizados e analisados por meio do aplicativo PDQuest. Os quatorze animais foram separados em dois grupos, onde seis animais foram considerados com boa congelabilidade (GFEs) e apresentaram uma média para vigor e motilidade espermática de $2,2 \pm 0,8$ e $41,8 \pm 22,9$, respectivamente, enquanto que o grupo de congelabilidade ruim (PFEs) foi composto por oito animais que apresentaram uma média de $1,9 \pm 0,6$ de vigor e $26,8 \pm 17,5$ de motilidade espermática. Foi encontrado uma média de $263 \pm 62,2$ spots por gel e um total de $234,2 \pm 54,6$ spots foi detectado de forma consistente nos géis dos quatorze animais. Foram encontrados 5 spots que divergiram significativamente entre os grupos, onde 3 foram encontrados com maior intensidade no grupo PFES e 2 spots foram mais expressos no GFEs. Conclui-se que estes cinco spots podem atuar como possíveis marcadores de congelabilidade para o sêmen suíno.

Palavras-chave: Sêmen congelado; Proteômica; Sêmen suíno.

ABSTRACT

The search for markers freezability aims to predict the behavior of the semen freezing process. Thus, this study aimed to evaluate the electrophoretic map of the plasma membrane proteins of porcine sperm and correlate them with protection to sperm cryopreservation of semen. For this, the semen Fourteen players were subjected to slow freezing and rapid thawing. After thawing were analyzed in the vigor and sperm motility, and from these results, the animals were separated into two groups: freezability good and bad. For the study of membrane proteins of sperm, they were subjected to two-dimensional electrophoresis. Gels were stained with colloidal Coomassie, scanned and analyzed using PDQuest application. Fourteen animals were separated into two groups, where six animals were considered good freezability (GFEs) and had an average sperm motility and vigor to 2.2 ± 0.8 and 41.8 ± 22.9 , respectively, whereas the group of freezability bad (PFEs) was composed of eight animals with a mean of 1.9 ± 0.6 to 26.8 ± 17.5 vigor and sperm motility. Found an average of 263 ± 62.2 spots per gel and a total of 234.2 ± 54.6 spots was consistently detected in the gels of the fourteen animals. Found 5 spots that differed significantly, where 3 were found with greater intensity in the group PFEs and 2 spots were more expressed in the group GFEs. We conclude that these five spots may act as potential markers freezability for boar semen.

Keywords: Frozen semen; proteomics, swine semen.

1 INTRODUÇÃO

O uso do protocolo de criopreservação seminal é o método mais eficiente para armazenar células espermáticas, visto que esta técnica possibilita uma conservação por um longo período de tempo (SAFRANSKI et al., 2011). No entanto, o uso de sêmen criopreservado representa menos de 1% a nível mundial (SARAIVA et al., 2005), isto porque as células espermáticas sofrem danos, em particular às membranas, após serem submetidas ao protocolo de congelamento, apresentando assim baixos índices reprodutivos quando comparado com o sêmen refrigerado (CARNEIRO et al., 2007).

Alguns estudos mostram que as células espermáticas de diversas espécies reagem de forma diferente ao processo de criopreservação, pois possuem variações quanto à tolerância ao choque térmico, à congelamento e à resistência osmótica (PURDY,

2006). Comparando o espermatozoide de suíno com outras espécies de mamíferos, esse apresenta maior sensibilidade a baixas temperaturas, principalmente devido às características de sua membrana, que exibe um baixo teor de colesterol e de fosfolípidos saturados (WATSON, 2000).

No entanto, os resultados de criopreservação do sêmen suíno parecem estar mais relacionados com as características do animal do que com o protocolo de criopreservação (MEDRANO et al., 2009). Isto pode estar relacionado com o fato de ejaculados coletados do mesmo animal apresentarem resultados semelhantes após a congelação, podendo então classificá-los como sêmen de congelabilidade boa ou ruim (WATSON, 1995).

Por esta razão, estudos tem sido feitos a nível de caracterização de proteínas e a identificação de alguns desses polipeptídeos (MOURA et al., 2006), e estes vem sendo utilizados como marcadores seletivos de fertilidade e possíveis marcadores de congelabilidade do sêmen.

Um exemplo desses estudos é a proteína HSP90AA1 que pode ser utilizada como um marcador molecular no sêmen suíno refrigerado para o choque térmico, onde baixas expressões desta proteína, estão relacionadas à alta sensibilidade das células espermáticas ao estresse térmico (CASAS et al., 2010).

Sendo assim, faz-se necessário a busca por marcadores de congelabilidade do sêmen suíno afim de que estes possam predizer a capacidade das células espermáticas de suportarem o processo de criopreservação. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o perfil eletroforético das proteínas da membrana plasmática do espermatozoide suíno e correlacioná-las com a proteção espermática ao processo de criopreservação do sêmen.

2 METODOLOGIA

2.1 Coleta e avaliação do sêmen *in natura*

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Ceará, em 25 de janeiro de 2012, cujo processo apresenta nº 11518234-9/72. Os animais utilizados para o estudo foram provenientes do Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia do Sêmen, da Faculdade de Veterinária, na Universidade Estadual do Ceará e da Granja Xerez Avícula LTDA, no Município de Maranguape, Ceará. Foram utilizados animais com idades entre 12 e 24 meses, em sistema rotineiro de trabalho. Antes de cada coleta, foi realizada uma higienização

externa do prepúcio com sabão neutro e água tratada, seguida de esgotamento prepucial por pressão manual e secagem da região com papel toalha descartável.

Um total de 14 reprodutores foram submetidos à coleta de sêmen uma vez por semana, pela técnica da mão enluvada, e coletados em recipiente com capacidade para 500 mL, coberto por uma gaze e protegido por envoltório térmico. A fração gelatinosa, retida pela gaze, foi desprezada e aproveitado o ejaculado total.

Após a coleta, o sêmen foi levado ao laboratório, onde foram feitas análises de volume (mL), medido em balança digital; de concentração ($\times 10^6$ sptz/mL), avaliada pelo espectofotômetro, e o total de espermatozoides ($\times 10^9$ sptz). O vigor espermático (0 a 5 – TONIOILLI, 1996) e motilidade espermática (0 a 100%) foram avaliados através da microscopia óptica, com uma amostra de sêmen (15 μ L) colocada entre lâmina e lamínula e levada ao microscópio em um aumento de 200 vezes. Estes exames serviram para a avaliação e controle do sêmen de cada ejaculado durante o período experimental, sendo aproveitado apenas aqueles com valores mínimos de vigor $\geq 3,5$ e de motilidade $\geq 85\%$. Após este critério de seleção, foi retirado do ejaculado total $2,5 \times 10^9$ sptz/ejaculado para o protocolo de congelamento e 10×10^9 sptz/ejaculado para o protocolo de proteômica.

2.2 Criopreservação do sêmen

Na criopreservação, o ejaculado foi submetido ao processo de congelamento lento e descongelamento rápido. Inicialmente, o sêmen foi incubado por 15 minutos a 30 °C e diluído (3vol:1vol) em Beltsville Thawing Solution (BTS).

Após diluição, o sêmen foi mantido à esta temperatura por mais 45 minutos. Em seguida, o sêmen diluído foi resfriado a 25 °C durante 30 minutos. Após este período, os tubos foram transferidos para o escuro por 2 horas a 17 °C, visando uma melhor congelabilidade dos espermatozoides. Logo após, as amostras foram centrifugadas a 800G/15 min. a 5 °C.

Após a centrifugação, o sêmen foi transferido para geladeira a 5 °C, onde foi desprezado o sobrenadante, e o pellet foi ressuspenso no diluente de resfriamento (20 % de gema de ovo e 34,23g de glicose), a uma concentração inicial de 6×10^9 células/mL. Após a ressuspensão, o sêmen ficou 60 minutos ainda a 5 °C. Ao final desse tempo, foi adicionado o diluente de congelamento, com a mesma composição do diluente de resfriamento acrescido do glicerol a 6% (2mL:2mL), com uma concentração final de 100×10^6 células/mL.

Em seguida, o sêmen foi envasado em palhetas de plástico de 0,5 mL e selados com álcool polivinílico em pó (PVC). Após o envase, as palhetas foram colocadas em uma rampa de congelação (-60 a -70 °C) a 5 cm acima do nitrogênio líquido por 30 minutos, e em seguida submersas em nitrogênio líquido (-196 °C).

Para a descongelação do sêmen, a palheta foi colocada no aparelho automático de descongelação da Minitub, onde foi submetida à uma temperatura de 39 °C durante 50 segundos. Após a descongelação o conteúdo da palheta, 0,5 mL do sêmen, foi resuspenso em 2 mL do diluente BTS, que estava à mesma temperatura. As amostras foram colocadas em tubos de ensaio e mantidas em banho maria a 39 °C para a avaliação da qualidade espermática através das análises de vigor e motilidade. Para tanto, foi necessário a remoção de uma alíquota 15 µL do sêmen resuspenso, colocada entre lâmina e lamínula, e analisada à luz da microscopia óptica em aumento de 200x.

Após estas análises, os ejaculados dos animais foram separados em dois grupos: o de congelabilidade boa (GFEs - *Good Freezability Ejaculates*) e o de congelabilidade ruim (PFEs - *Poor Freezability Ejaculates*). Esta separação foi feita através dos resultados das análises de vigor e motilidade espermática após a descongelação seminal, onde foram utilizados valores mínimos de vigor $\geq 2,0$ e de motilidade $\geq 40\%$ para serem considerados do grupo de congelabilidade boa e os demais foram considerados de congelabilidade ruim (CASAS et al., 2010).

2.3 Protocolo de proteômica

Para o protocolo de proteômica, imediatamente após a avaliação do sêmen *in natura*, alíquotas de sêmen totalizando 10×10^9 sptz foram separadas em tubo de ensaio de 50 mL contendo o inibidor de protease Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) até atingir uma proporção de 0,5% (v/v). O sêmen juntamente com o inibidor de protease foi centrifugado a 800G, 4 °C/15 minutos, para separação das células espermáticas do plasma seminal.

2.3.1 Purificação da fração proteica da membrana dos espermatozoides

Após a primeira centrifugação, realizada para separar as células espermáticas do plasma seminal, o *pellet* foi lavado três vezes com PBS pH 7.4 (1:1, v/v) e centrifugado a 800 G/ 15 minutos a 4 °C. Em seguida, o pellet foi resuspendido em PBS e armazenado a -80 °C. As proteínas de membrana espermática foram extraídas conforme a metodologia escrita por van Tilburg et al., (2013).

2.3.2 Eletroforese bidimensional

Para a pesquisa delineada neste projeto, a concentração total do extrato proteico da membrana foi quantificada pelo método de Bradford (1976). Em seguida, uma concentração de 400 µg de proteína foi submetido a eletroforese bidimensional, conforme metodologia já utilizada pelo grupo de pesquisa em biologia da reprodução da UFC (VAN TILBURG et al., 2013).

Em resumo, 400 µg de proteína de membrana foi misturada a um volume de tampão de re-hidratação (8M uréia, 1M tiouréia, 2% CHAPS, 10% glicerol, 2% anfólitos na faixa de pH 4 a 7, 25mM DTT e 0,002% de azul de bromofenol) em uma quantidade suficiente para completar 250µL. Esta mistura foi então adicionada às canaletas da bandeja de hidratação e incubada com tiras de gradiente de pH imobilizado (GE Lifesciences, USA) de 13cm, com faixa de pH linear indo de 4 à 7, por um período de aproximadamente 20 horas.

A focalização isoeétrica foi realizada através do equipamento IPGphor 3 (GE Lifesciences, USA) com a seguinte programação: 250V por 3 horas; 500V por 1 hora; 800V por 1 hora; 1000V por 1 hora e 8000V por aproximadamente 5 horas, totalizando 39.000 Vh.

Após a focalização, as tiras foram equilibradas no tampão de equilíbrio I (6M uréia, 50mM Tris-HCl pH 8,8, 29,3% glicerol, 2% SDS e 1% DTT) por 20 minutos, e em seguida incubadas por mais 20 minutos com a solução de equilíbrio II (mesma composição da solução I, substituindo-se o DTT por 2,5% de iodoacetamida). Após a etapa de equilíbrio, as proteínas foram separadas em géis de poliacrilamida, SDS-PAGE 12,5%, (Hoefer SE 600, GE, USA) e, em seguida, os géis foram corados com Commassie Blue coloidal.

2.3.3 Digitação e análise dos géis

As imagens dos géis foram digitalizadas a 300 dpi (ImageScanner II, GE, USA) e armazenadas como arquivos TIFF para análise através do aplicativo PDQuest versão 8.0.1 (Bio-Rad Laboratories, USA), conforme metodologia validada por Moura et al. (2006).

Em resumo, um gel representativo foi criado com base nos géis de todas as amostras e os *spots* consistentemente presentes nos mapas também foram adicionados ao gel sintético. Proteínas detectadas em diferentes regiões dos géis foram utilizadas

como marcos de localização de forma a permitir o alinhamento correto de cada *spot* nos diferentes mapas e comparações entre estes mapas.

A quantificação dos *spots* foi atribuída em partes por milhão (ppm) da densidade óptica integrada total de cada gel, fornecida pelo aplicativo PDQuest.

2.4 Análise estatística

Os dados referentes à intensidade óptica dos *spots* detectados nos mapas eletroforéticos bidimensionais dos grupos de alta e baixa congelabilidade, GFEs e PFEs, respectivamente, foram submetidos à avaliação de sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e também de sua assimetria e curtose por meio do procedimento UNIVARIATE do aplicativo estatístico SAS (2002). As variáveis foram transformadas por $\log(x+1)$, quando necessário (Shapiro-Wilk $<0,80$, $p < 0,05$) para aproximar sua distribuição à normalidade.

As intensidades dos *spots* foram submetidas à análise de variância, por meio do procedimento GLM do SAS e as médias foram comparadas pelos teste t de Student (CV $>30\%$) e Student-Newman-Keuls (SNK; CV $<15\%$).

Os resultados foram apresentados na forma gráfica das médias e erros padrão da média das intensidades dos *spots* proteicos detectados em relação aos grupos de GFEs e PFEs.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sêmen *in natura* dos 14 animais utilizados para o presente experimento apresentaram aspecto normal e coloração branco leitosa; volume médio de 249,4 mL e concentração média de $318,34 \times 10^6$ spz/mL. Tais características estão dentro da normalidade para a espécie suína (CORRÊA et al., 2001). A avaliação microscópica do mesmo, apresentou um valor médio para o vigor espermático de $4,2 \pm 0,4$ e para a motilidade espermática de $90 \pm 5,0$. Estes valores se mantiveram acima dos parâmetros mínimos estipulados para serem utilizados no experimento (vigor $\geq 3,5$ e motilidade $\geq 85\%$).

Os animais foram separados em grupos de PFEs e GFEs, através dos resultados de vigor e motilidade espermática analisados logo após a descongelação seminal. O ponto de corte para considerar o animal no grupo GFEs era vigor $\geq 2,0$ e motilidade $\geq 40\%$. Dos quatorze animais utilizados no presente estudo, seis foram considerados GFEs, e oito foram considerados PFEs. Logo, os animais GFEs apresentaram uma média para vigor espermático de $2,2 \pm 0,8$ e motilidade espermática

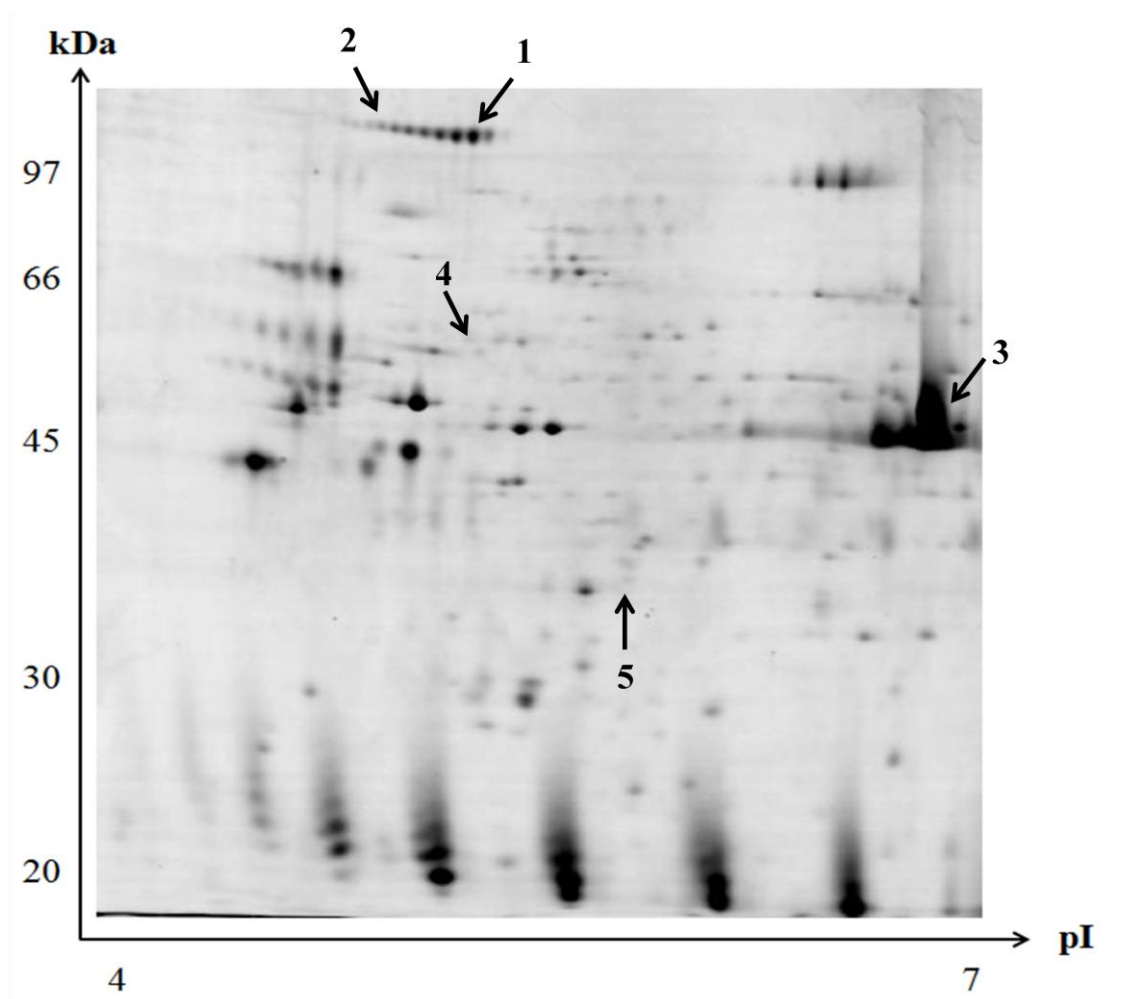
41,8±22,9, enquanto que o grupo PFEs apresentou 1,9±0,6 de vigor espermático e 26,8±17,5 de motilidade espermática.

Os resultados dos parâmetros avaliados após a descongelação quanto a viabilidade do sêmen congelado neste estudo confirmam que, mesmo sob as mesmas condições de criopreservação, o grau de alterações produzidas pelo choque térmico não é o mesmo para ejaculados proveniente de animais diferentes, conforme anteriormente discutido por Gutiérrez-Pérez et al., (2009).

Quanto a análise das proteínas de membrana do espermatozoide suíno, foi detectado em média, 263±62,2 *spots* por gel, de acordo com o pareamento gerado pelo aplicativo PDQuest[®], o qual representa uma combinação de todos os *spots* presentes no gel de referência (Figura 1). Um total de 234,2±54,6 *spots* foi detectado de forma consistente nos géis dos quatorze animais. Já no grupo GFEs apresentou 211,8±64,4 *spots* em comum entre os seis animais do grupo, enquanto que no PFEs apresentou 251±42,8 *spots* em comum entre os oito animais.

Comparando a quantidade de *spots* da membrana do espermatozoide de suíno com ovino, pôde-se observar que esse apresentou uma maior média de *spots*, visto que em ovinos da raça Morada Nova foi detectado uma média de 133±4,6 *spots* por gel de proteínas de membrana de espermatozoides, com 107 *spots* consistentemente presente em todos os géis (VAN TILBURG et al., 2013).

Figura 1: Gel Bidimensional de proteínas de membrana de espermatozoides suínos. Amostras focalizadas em tiras de 13 cm com pI de 4 – 7. SDS-PAGE (12,5%). 400 ug de proteínas por Gel. As proteínas foram coradas com Coomassie blue coloidal.



Quanto aos totais de *spots* analisados, foi detectado diferença significativa ($p < 0,05$) na intensidade de cinco deles (Figura 1). Os *spots* 1, 2 e 3 foram encontrados em uma intensidade maior nos animais do grupo PFes (Figura 2), e os *spots* 4 e 5 foram encontrados com uma maior intensidade nos animais do grupo GFes (Figura 3).

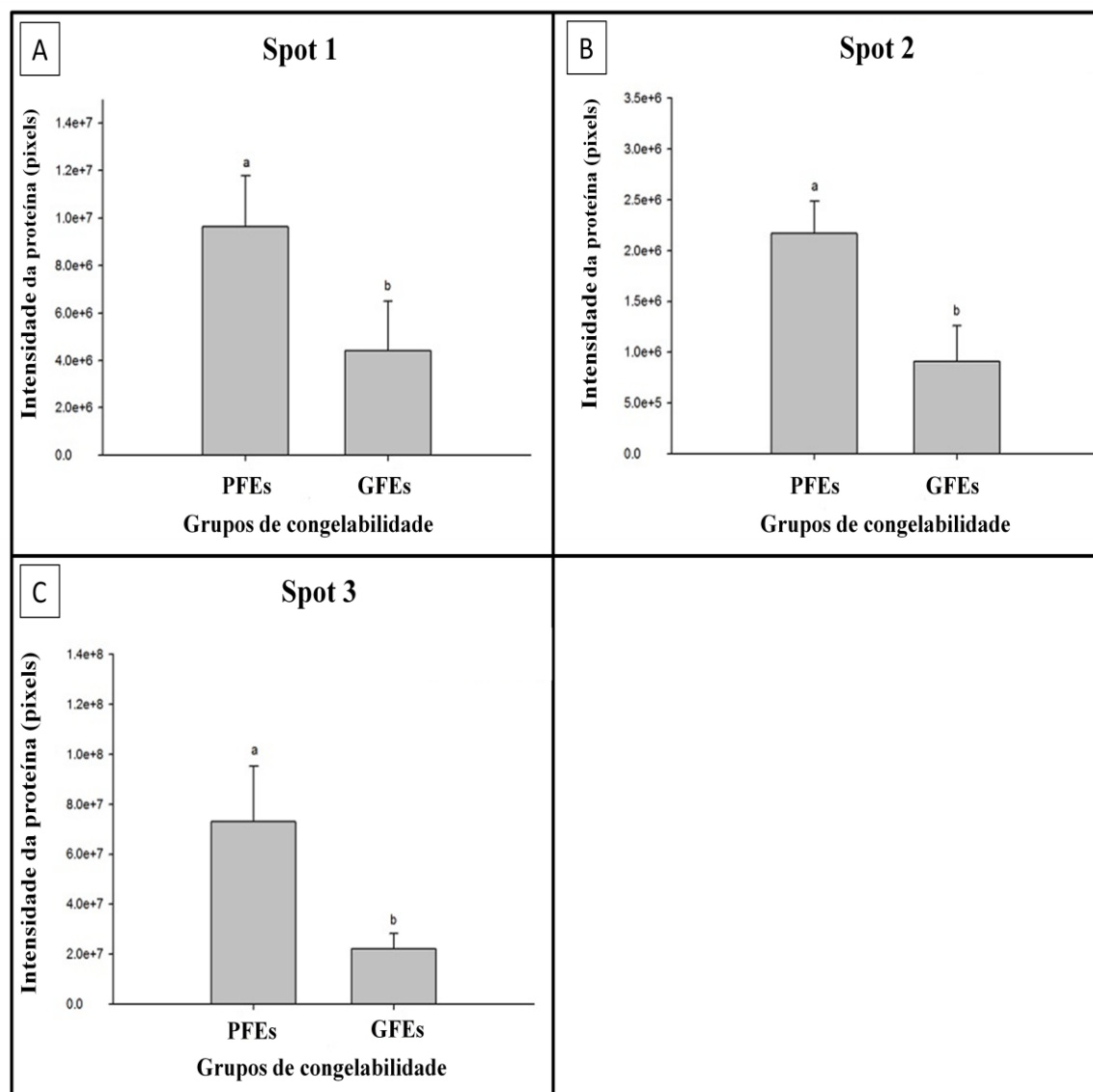
O *spot* 1, com 117,2 kDa e 5,3 pI, foi detectado nos oito animais do PFes, enquanto que no grupo GFes, foi detectado nos seis animais (Figura 2A).

O *spot* 2, com 121,4 kDa e 5,0 pI, foi detectado em sete animais do grupo PFes e em cinco animais do GFes (Figura 2B).

Já o *spot* 3, com 49,8 kDa e 6,7 pI, foi encontrado em seis animais de cada grupo (Figura 2C).

Figura 2: Intensidades (médias e erros-padrão) dos *spots* 1, 2 e 3 no mapa bidimensional da membrana dos espermatozoides de suínos, agrupados de acordo com os resultados de

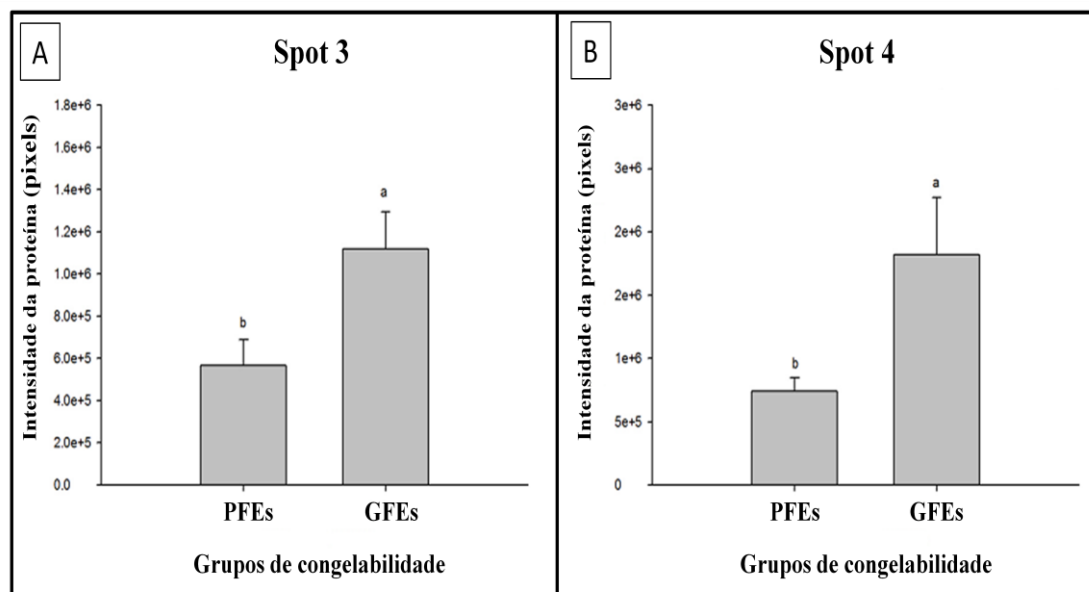
vigor e motilidade espermática analisados após a descongelação seminal, dividindo-os em PFEs e GFEs. Letras distintas diferem pelo teste de t de Student (CV >30%).



O *spot* 4, com 61,4 kDa e 5,3 pI, foi detectado nos oito animais do PFEs, enquanto que no grupo GFEs, foi detectado em quatro animais (Figura 3A).

E o *spot* 5, com 36,8 kDa e 5,8 pI, foi detectado em seis animais do grupo PFEs, enquanto que no grupo GFEs, foi encontrado em cinco animais (Figura 3B).

Figura 3: Intensidades (médias e erros-padrão) dos *spots* 4 e 5 no mapa bidimensional da membrana dos espermatozoides de suínos, agrupados de acordo com os resultados de vigor e motilidade espermática analisados após a descongelação seminal, dividindo-os em PFEs e GFEs. Letras distintas diferem pelo teste de t de Student (CV >30%).



As diferenças quanto à intensidade da expressão de determinadas proteínas podem variar para cada animal, mesmo que estes sejam da mesma espécie. Estas diferentes expressões podem influenciar diretamente na proteção espermática ao processo de criopreservação do sêmen, visto que em estudos anteriores mostraram diferença na intensidade de proteínas e correlacionaram com os resultados da criopreservação do sêmen suíno. Como resultados, observaram que a proteína Acrosina (ACRBP) foi encontrada com maior intensidade em GFEs e a Triose Fosfato Isomerase (TPI) foi mais expressas em PFEs, podendo então estas duas proteínas atuarem como marcadores de congelabilidade para sêmen suíno (VILAGRAN et al., 2013).

4 CONCLUSÃO

A capacidade das células espermáticas resistirem ao processo de criopreservação seminal é diferente para cada animal, mesmo sendo da mesma espécie. Desta forma, o uso de marcadores de congelabilidade representa uma vantagem para a criopreservação do sêmen, porque evita utilizar ejaculados que não conseguem resistir ao estresse causado por este procedimento. O presente estudo encontrou cinco possíveis marcadores de congelabilidade, onde dois destes podem ser utilizados como marcadores de boa congelabilidade, visto que estão presentes em ejaculados que apresentam viabilidade espermática após a criopreservação do sêmen.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding" *Anal. Biochem.* 72:248-254, 1976.

CARNEIRO, G.F.; SILVA, S.V.; MEDEIROS, L.R.D.; GOMES NETO, O.; Procópio, O.C.S. Utilização prática de sêmen congelado. In: ASSIST (Simpósio Brasileiro de Reprodução Assistida em Caprinos e Ovinos), 1, 2007. Anais..., Gravatá, PE: ASSIST, 2007. CD-ROM.

CASAS, I.; SANCHOA, S.; BALLESTERB, J.; BRIZA, M.; PINARTA, E.; BUSSALLEUA, E.; YESTEA, M.; FÀBREGAA, A.; RODRÍGUEZ-GILC, J.E.; BONETA, S. The HSP90AA1 sperm content and the prediction of the boar ejaculate freezability. *Theriogenology* 2010;74:940–50.

CORRÊA, M.N.; MEINCKE, W.; LUCIA, J.R.T.; DESCHAMPS, J.C. Inseminação artificial em suínos. Pelotas: Printpar Gráfica e Editora, 2001.

GUTIÉRREZ-PÉREZ, O.; JUÁREZ-MOSQUEDA, M.D.E .L.; CARVAJAL, S.U.; ORTEGA, M.E. Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity. *Criobiology* 2009;58(3):287–92.

MEDRANO, A.; HOLT, W.V.; WATSON, P.F. Controlled freezing studies on boar sperm cryopreservation. *Androl* 2009;41(4):246 –50.

MOURA, A.A.; KOC, H.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *J Androl*, v.27, p.201-211, 2006.

PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rumin Res*, v.63, p.215-225, 2006.

SAFRANSKI, T.J.; FORD, J.J.; ROHRER, G.A.; GUTHRIE, H.D. Plenary contribution to International Conference on Boar Semen Preservation 2011. Genetic

selection for freezability and its controversy with selection for performance. *Reprod Domest Anim*, 46 (Suppl. 2) (2011), pp. 31–34

SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; NAGY, S.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUES-MARTINES, H. Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effects on sperm viability. *Theriogenology*, v.63, p.1320-1333, 2005.

TONIOLLI, R. Pouvoir fecondant des spermatozoïdes de verrat: amèlioration des conditions de conservation. Université François Rabelais de Tours - France, These de Doctorat, 91p., 1996.

VAN TILBURG, M.F. ; RODRIGUES, M.A.M. ; MOREIRA, R.A. ; MORENO, F.B. ; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O. ; CÂNDIDO, M.J.D. ; MOURA, A.A. . Membrane-associated proteins of ejaculated sperm from Morada Nova rams. *Theriogenology*, v. 79, p. 1247-1261, 2013

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 2000;60–61:481–92.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*, 7 (1995), pp. 871–891

9 CONCLUSÃO

Pode-se constatar que o ACP-103® pode ser utilizado como um diluente alternativo na criopreservação do sêmen suíno, pois, além de ser uma opção simples, de baixo custo e de fácil obtenção, não compromete a qualidade espermática.

Quanto à curva de resfriamento utilizada, esta mantém a viabilidade espermática durante todo o processo de redução da temperatura, podendo então ser utilizada em protocolos futuros.

No entanto, mesmo sob as mesmas condições de criopreservação, diluente e curva de resfriamento, cada animal apresenta um resultado para a congelação do sêmen. Pois, o grau de alterações produzidas pelo choque térmico não é o mesmo para ejaculados proveniente de diferentes animais, e essas diferenças podem estar relacionadas quanto à intensidade da expressão de determinadas proteínas, que variam para cada animal, mesmo que estes sejam da mesma espécie. Sendo assim, estas diferentes expressões podem influenciar diretamente na proteção espermática ao processo de criopreservação do sêmen.

Desta forma, os cinco possíveis marcadores de congelabilidade encontrados no presente trabalho representa uma vantagem para a criopreservação do sêmen, porque evita utilizar ejaculados que não conseguem resistir ao estresse causado por este procedimento.

10 PERSPECTIVAS

A busca por melhores resultados na criopreservação do sêmen é necessária, pois alguns pesquisadores apontam esta técnica para um futuro promissor, devido aos avanços das novas tecnologias e equipamentos de congelamento de sêmen. Alguns, afirmam até que o uso do sêmen criopreservado substituirá o uso do sêmen refrigerado. Onde o sêmen congelado de suínos será comercializado nos grandes Centros de Inseminação Artificial e intensamente utilizado em granjas comerciais.

Através de maiores estudos, a criopreservação poderá ter uma maior aceitação e ser executada com maior frequência. Já os cachasos devem ser testados individualmente, utilizando marcadores moleculares de congelabilidade espermática, para prever o resultado de cada animal para a criopreservação, antes de serem utilizados na produção para evitar gastos desnecessários.

11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALBERS, J.G.; JOHNSON, L.A.; RADEMARKER, J.H.M. ATP content fresh and frozen-thawed boar semen and its relation ship to sperm concentration and fertility. In: International Conference on Deep Freezing Boar Semen, 1, 1985. Uppsala, Proceedings... Uppsala: Swedish Univ. Agric. Sci, p. 259-264, 1985.

AIRES, F.P; TONIOLLI, R. Congelação/descongelação e conservação de sêmen suíno. In: Reunião Anual da SBPC, 57, 2005, Fortaleza, CE. Anais... São Paulo: SBPC/UECE, 2005. Disponível em: <<http://www.spcnet.org.br/livro/57ra>>. Acessado em: 06 de Julho de 2012.

ALBERTI, K. Congelação do sêmen bovino: novos enfoques em meios diluentes. 2004. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual de São Paulo, FMVZ, Botucatu, SP, 2004.

ALMEIDA, J.; BALL, B.A. Effect of α -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. *An Reproduction Science.*, v. 87, p. 321-337, 2005

ARAÚJO, L.L.; OLIVEIRA, K.G.; LIMA, J.S.; PANTOJA, P.S.P.; ARAÚJO, J.B.; DOMINGUES, S.F.S. Preservação de sêmen de *Cebus apella* (macaco-prego) em diluidor à base de água de coco a 37°C. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17, 2007, Curitiba, PR. Anais... Belo Horizonte: CBRA, 2007. Disponível em: <<http://www.cbra.org.br>>. Acessado em: 06 de Julho de 2012.

AZEVEDO, D.M.M.R.; TONIOLLI, R. Água de coco estabilizada suplementada com antibióticos e ácido 3-indol acético na conservação de sêmen de caprinos marota. *Ciênc Anim*, v.9, p.37-42, 1999.

BARRETO, M.A.P; SILVA, J.F.S; FAGUNDES, B.; CAIADO, J.R.C; SOUZA, G.V; SHIMOYA, A. Efeito de proteínas do plasma seminal equino com massa superior a 10 kDa concentradas 10 vezes sobre a congelabilidade so sêmen. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.37, n.12, p.2115-2119, 2008.

BERNARDI, M.L. Technologies used in the assessment of boar ejaculate to produce high quality semen doses. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 36, p. 5-16, 2008.

BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; BENNEMANN, P.E.; BERNADI, M.L.; WOLLMANN, E.B.; FERREIRA, F.M.; NETO, G.B. Suinocultura em ação: Inseminação artificial na suinocultura tecnificada. Copyright, Porto Alegre, Brasil, p.85, 2005.

BRAZ, V.B.; ARAÚJO, A.A.; NUNES, J.F.; MACHADO, V.P.; MOURA, A.A.A.; OLIVEIRA, K.P.L. Viabilidade do sêmen ovino diluído em água de coco em pó. *Rev Bras Reprod Anim*, v.27, p.99-107, 2003.

BUHR, M.M.; CURTIS, E.F.; KAKUDA, N.S. Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology*. v.31, p.224- 238, 1994.

BURGESS, S. C. Proteomics in the chicken: tools for understanding immune responses to avian diseases. *Poultry Science*, v.83, p.552-573, 2004.

CAMERON, R.D.A. Porcine reproduction now and in the future. In: Congress of International Pig Veterinary Society, 15., 1998, Birmingham. Proceedings... Birmingham: IPVS, p.209, 1998.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Use of the powdered coconut water (ACP-106) for cryopreservation of canine spermatozoa. *Animal Reproduction*, v.2, n.4, p.257-262, 2005.

CASAS, I.; SANCHO, S.; BALLESTER, J.; BRIZ, M.; PINART, E.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; FÀBREGA, A.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; BONET, S. The HSP90AA1 sperm content and the prediction of the boar ejaculate freezability. *Theriogenology*, v.74, p. 940-950, 2010.

CASAS, I.; SANCHO, S.; BRIZ, M.; PINART, E.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; BONET, S. Freezability prediction of boar ejaculates by functional sperm parameters and sperm proteins. *Theriogenology*, v.72, p.930–948, 2009.

CAVALCANTI, S.S. Suinocultura dinâmica. Editora MZV, Minas Gerais, Brasil, p. 494, 1998.

COLENBRANDER, B.; FEITSMA, H.; GROOTEN, H.J. Optimizing semen production for artificial insemination in swine. *J. Reprod. Fertil., Suppl.* 48, p. 207-215, 1993.

COLLARES T., BONGALHARDO D.C., DESCHAMPS J.C., MOREIRA H.L.M. Transgenic animals: The melding of molecular biology and animal reproduction *Animal Reproduction*, v.2, p.11-27, 2005.

CORRÊA, M.N.; MEINCKE, W.; LUCIA Jr., T.; DESCHAMPS, J.C. Inseminação artificial em suínos. Copyright. Pelotas, Brasil, p.194, 2001.

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.

DE VENEVELLES, P.; CHICH, J. F.; FAIGLE, W.; LOEW, D.; LABBE, M.; GIRARD-MISGUICH, F.; PERY, P. Towards a reference map of *Eimeria tenella* sporozoite proteins by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *International Journal of Parasitology*, v.34, n. 12, p.1321-1331, 2004.

DELL'AQUA JUNIOR, J.A; PAPA, F.O.; ZAHN, F.S. Novo teste hiposmótico de avaliação da integridade da membrana plasmática de sêmen congelado equino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 26, n. 3, p. 189-191, 2002.

EINARSSON, S. Concluding Remarks. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 88, p. 165-166, 1992.

FUCHS, D.; WINKELMANN, I.; JOHNSON, I. T.; MARIMAN, E.; WENZEL, U.; DANIEL, H. Proteomics in nutrition research: principles, technologies and applications. *British Journal of Nutrition*, v. 94, n. 3, p. 302-314, 2005.

GADEA, J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology*, v. 63, p. 431-444, 2005.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet. Clin. North. Am.: Equine Practice*, v. 12, p. 131-147, 1996.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. *Reprodução Animal*. 7ª ed. Manole, São Paulo, p.530, 2003.

HESS, E.A.; LUDWICK, T.M.; TEAGUE, H.S. Motility of boar spermatozoa as influenced by semen freezing procedures. *Journal of Animal Science*, v.19, p.926-931, 1960.

JELÍNKOVÁ, P.; MANÁSKOVÁ, P.; TICHÁ, M.; JONÁKOVÁ, V. Proteinase inhibitors in aggregated forms of boar seminal plasma proteins. *Int. J. Biol. Macromol.*, v.32, p.99-107, 2003.

JOBIM, M.I.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.G.; SOUZA, D.O.; WALD, V.B.; TRAMONTINA, F.; MATTOS, R.C. Two-dimensional polyacrylamide gel

electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*, v.61, p.253-266, 2004.

JOHNSON, A.W. Coconut water as a constituent of semen diluents in the tropics, *Veterinary Bulletin, London*, v.35, n.10, p.605-7, 1965.

JOHNSON, L.A.; AALBERS, J.G.; WILLEMS, C.M.; SYBESMA, W. Use of boar spermatozoa for artificial insemination. I. Fertilizing capacity of fresh and frozen spermatozoa in sows on 36 farms. *J. Anim. Sci.*, v.52. p. 1130-1136, 1981.

JOHNSON, L.A., AALBERS, J.G., GROOTEN, H.J.G. Artificial insemination of swine: fecundity of boar semen stored in Beltsville TS (BTS), modified modena (MM), or MR-A and inseminated on one, three and four days after collection. *Zuchthygiene*, 23(2), p.49-55, 1988.

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

JOHNSON, L.H. Fertility results using frozen boar spermatozoa: 1970 to 1985. In: *International Conference on Deep Freezing of Boar Semen*, 1, Uppsala. Proceeding... Uppsala: Swedish Univ. Agric. Sci. p. 199-222, 1985.

KASAI, M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Animal Reproduction Science*, v.42, p.67-75, 1996.

KOWALSKI, R., GLOGOWSKI, J., KUCHARCZYK, D., GORYCZKO, K., DOBOSZ, S., CIERESZCO, A. Proteolytic activity and eletrophoretic profiles pf proteases from seminal plasma of teleosts. *Journal of Fish Biology*, 2003, v.63, p. 1008-1019.

LAFOREST, J.P.; ALLARD,D. Comparison of four extenders for long-term storage of fresh boar semen. *Reproduction in Domestic Animals*, v.31, p.275-276. 1996.

LAHNSTEINER, F., MANSOUR, N., BERGER, B. Seminal plasma proteins prolong the viability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology*, v.62, p. 801-808, 2004.

LEVIS, D. Liquid boar semen production: current extender technology and where do we go from here. In: *International Conference on Boar Semen Preservation*. 4., Beltsville, Maryland USA. Proceedings... Lawrence : Allen, p.121-128, 2000.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Male reproductive function and semen. Themes and trends in physiology, biochemistry and investigative andrology. Berlin: Springer-Verlag, p.495, 1981.

MANUAL PARA EXAME ANDROLÓGICO E AVALIAÇÃO DE SÊMEN ANIMAL. 2ª Ed., Belo Horizonte. CBRA, 1998.

MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? Theriogenology, v. 57, p. 327-344, 2002.

MEDRANO, A.; HOLT, W.V. Variación individual en susceptibilidad del semen porcino al congelado-descongelado [Inter-individual boar sperm susceptibility to freezing-thawing protocols]. Archiv Zootec, v.47, p.319 –27, 1998.

MEDRANO, A.; HOLT, W.V.; WATSON, P.F. Controlled freezing studies on boar sperm cryopreservation. Journal of Andrology, 41(4), p.246 –250, 2009.

MILLER, D.J.; WINER, M.A.; AX, R.L. Heparin Binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. Biology of Reproduction, v. 42, p. 899-915, 1990.

MOURA, A.A.; CHAPMAN, D.A.; KOC, H.; KILLIAN, G.J. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. Anim. Reprod. Sci., in press, 2006.

NUNES, J.F. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de animais domésticos e do homem. Rev Bras Reprod Anim, v.22, p.109-112, 1998.

NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M. Strategies to improve the reproductive efficiency of goats in Brazil. Small Ruminant Research. v.98, p.176–184, 2011.

NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M. Utilização da água de coco como diluidor de sêmen de caprinos e ovinos. Rev Cient Prod Anim, v.1, p.17-26, 1999.

O' FARREL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem, v.250, p.4007-4021, 1975.

PAQUIGNON, M., BUSSIÈRE, J., BARITEAU, F. Resultats recents en matiere de technologie de la conservation de la semence de verrat. J. Rech. Porc. en France, v.19, p.63-78, 1987.

PEÑA, A.I. Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelacion-descongelacion. 329f. Tese - Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, 1997.

RATH, D.; BATHGATE, R.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; ROCA, J.; STRZEZEK, J.; WABERSKI, D. Recent advances in boar semen cryopreservation. Soc Reprod Fertil Suppl, v.66, p.51– 66, 2009.

REED, H.C.B. Current use of frozen boar semen - future need of frozen boar semen. In: International Conference on Deep Freezing of Boar Semen, 1, Uppsala. Proceedings...Uppsala: Swedish Univ. Agric. Sci. p. 225-227, 1985.

ROCA, J.; HERNÁNDEZ, M.; CARVAJAL, G.; VÁZQUEZ, J.M.; MARTÍNEZ, E.A. Factors influencing boar sperm cryosurvival. Journal Animal Science, 84(10), p.2692–9, 2006.

ROCHA, T. L.; COSTA, P. H. A.; MAGALHÃES, J. C. C.; EVARISTO, R. G. S.; VASCONCELOS, E. A. R.; COUTINHO, M. V.; PAES, N. S.; SILVA, M. C. M.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Eletroforese Bidimensional e análise de proteomas. Embrapa, Comunicado Técnico 136, 2005.

SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F.; OLIVEIRA, K.P.L. Utilização de diluentes à base de água de coco in natura e em pó na inseminação artificial programada de cabras. Rev Bras Reprod Anim Supl, n.5, p.175-182, 2002.

SANTOS, P. M.; TEIXEIRA, M. C.; CORREIA, I. S. A análise proteômica quantitativa na revelação de mecanismos de resposta a estresse químico em microorganismos. Boletim de Biotecnologia, v.77, p.7-17, 2004.

SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; NAGY, S.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUES-MARTINES, H. Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effects on sperm viability. Theriogenology, v.63, p.1320-1333, 2005.

SCHEID, I.R. Commercial Swine Artificial Insemination in Brazil: development and current use. Reproduction in Domestic Animals, Suppl. 1, p.299-301, 1991.

SCHEID, I.R.; SILVEIRA, P.R.S. Uma análise da IA na suinocultura brasileira .Suín Cia, v.1, n.1, p.25-28, 2002.

SCHEID, I.R.; WENTS, I.; SOUZA, N.M.; MARIANO, N.M. Resultados Comparativos da Inseminação Artificial em Suínos com Sêmen Congelado e Resfriado. Comunicado Técnico. EMBRAPA–CNPSA, Março, p. 1–2, 1986.

SILVA, T.F.P.; ACKERMANN, C.L.; PINHEIRO, F.T.S.; SILVA, L.D.M. Uso da água de coco em pó (ACP-117) na criopreservação de sêmen de gato doméstico. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17, 2007, Curitiba, PR. Anais... Belo Horizonte: CBRA, 2007. Disponível em: <<http://www.cbra.org.br>>. Acessado em: 06 de Julho de 2012.

SQUIRES,E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; McCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. Principles of cryopreservations. In: Cooled and frozen Stallion Semen, b.09, 1999.

STARITA-GERIBALDI, M.; POGGIOLI, S.; ZUCCHINI, M.; GARIN, J.; CHEVALLIER, D.; FENICHEL, P.; POINTIS, G. Mapping of seminal plasma proteins by two-dimensional gel electrophoresis in men with normal and impaired spermatogenesis. Molecular Human Reproduction, v. 7, n.8, p.715-722, 2001.

STRZEŻEK, J.; WYSOCKI, P.; KORDAN, W.; KUKLIŃSKA, M.; MOGIELNICKA, M.; SOLIWODA, D.; FRASER, L. Proteomics of boar seminal plasma – current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. Reprod. Biol., v.5, p.279-290, 2005.

SURIYASOMBOON, A.; LUNDEHEIM, N.; KUNAVONGKRIT, A.; EINARSSON, S. Effect of temperature and humidity on reproductive performance of crossbred sows in Thailand. Theriogenology., v.65, p.606-628, 2006.

THURSTON, L.M.; SIGGINS, K.; MILEHAM, A.J.; WATSON, P.F.; HOLT, W.V. Semen cryopreservation: a genetic explanation for species and individual variation? Cryo Letters, 23(4), p.255– 262, 2002.

TONIOLLI, R. Pouvoir fecondant des spermatozoïdes de verrat: amèlioration des conditions de conservation. Université François Rabelais de Tours - France, These de Doctorat, p.91, 1996.

TONIOLLI, R.; MESQUITA, D.S.M. Fertilidade de porcas inseminadas com sêmen diluído em água de coco estabilizada e com BTS. Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v.14, n.4, p.249-54, 1990.

TULI, R.K.; SINGH, M.; MATHAROO, J.S. Effect of difference extenders on glutamic oxalacetic transaminase (GOT) and glutamic pyruvic transaminase (GPT) release from buffalo semen. *Theriogenology*, v. 18, p. 55-59, 1982.

VISINTIN, J.A; MARTINS, J.F.P.; BEVILACQUA, E.M.; MELLO, M.R.B.; NICÁCIO, A.C.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A. Cryopreservation of *bos taurus* vs *bos indicus* embryos: Are they really different? *Theriogenology*, v.57, p.345-359, 2002.

VOET, D.; VOET, J. G. Bioquímica - 3ªed. Artmed, p.149-150, 2006.

WATSON, P.F. The causes of reduce fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v.60, p.481-492, 2000.

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

WEITZE, K.F. The use of “long-term extender” in pig AI– a view of the international situation. *Pig News and Information*, v.11, n.1, p.23- 26, 1990.

WILKINS, M. R.; WILLIAMS, K. L.; APPEL, R. D.; HOCHSTRASSER, D. F. Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics. p.243, 1997.

WOELDERS, H. Maintaining quality of boar sperm during storage and transportation. *PIGS - Misset*, v.8, p.22-23, 1992.

WOELDERS, H. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Veterinary Quarterly*, v.19, n.3, p.135-138, 1997.

WOLDERS, H.; TEN NAPEL, J. Semen in straws. *Pig Int*, v.35, n.4, p.10-14, 2005.

YAMAKAWA, K.; YOSHIDA, K.; NISHIKAWA, H.; KATO, T.; IWAMOTO, T. Comparative Analysis of Interindividual Variations in the Seminal Plasma Proteome of Fertile Men With Identification of Potential Markers for Azoospermia in Infertile Patients. *Journal of Andrology*, v.28, p. 858–865, 2007.