



A ação de diferentes tempos de *Holding Time* sobre os parâmetros de motilidade total e progressiva

The action of different periods of Holding Time on the total and progressive motility parameters

Matheus Saliba Monteiro¹, Mariana Andrade Torres¹, Marina da Silva Passarelli¹, Bruno Bracco Donatelli Muro¹, Simone Maria Massami Kitamura Martins¹, Rafaella Fernandes Carnevale¹, Frederico Ozanan Papa², Marco Antônio Alvarenga², José Antônio Dell' Aqua Junior², Flávio Vieira Meirelles³, André Furugen Cesar de Andrade^{1,*}

¹Núcleo de Pesquisa em Suínos - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, Pirassununga, SP, Brasil; ²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, SP, Brasil; ³Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, USP, Pirassununga, SP, Brasil.

*E-mail: andrefc@usp.br

Durante as etapas de criopreservação do sêmen suíno, é comum que ocorram diversos danos aos espermatozoides. As injúrias durante a criopreservação são muitas vezes causadas por choques térmicos, resultando em queda de motilidade, e a fim de minimizar a ocorrência desses efeitos deletérios, é utilizado o *Holding Time* (HT). Essa técnica consiste em refrigerar o sêmen anteriormente à congelação, comumente por até 24 horas, esse contato prévio possibilita maior interação entre os espermatozoides e os componentes do plasma seminal, melhorando a estabilidade da arquitetura lipídica da membrana plasmática e a capacidade de suportar o choque térmico, resultando em aumento da motilidade pós-descongelação. Foi realizada a coleta da fração rica do ejaculado de 5 cachorros (n=15), e após as análises *in natura* , o sêmen foi diluído em BTS na proporção 1:2 (sêmen:diluidor) e divididos nos seguintes tempos de HT: HT0 (0 hrs), HT4 (4 hrs), HT8 (8 hrs), HT12 (12 hrs), HT24 (24 hrs), HT28 (28 hrs) e HT32 (32 hrs). Decorrido o HT, as amostras foram centrifugadas (2400xg/3 min), o sobrenadante (BTS + plasma seminal) desprezado e o pellet suspenso em diluidor para congelação de sêmen suíno à base de gema de ovo (BotuSui[®] – Botupharma Botucatu, SP, Brasil) na concentração de 600 x 10⁶ espermatozoides/mL. O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,5 ml e criopreservadas em sistema automático (TK Tecnologia em Congelação[®], Uberaba-MG, Brasil). As amostras foram descongeladas a 37 °C e analisadas para motilidade total (MT) e progressiva (MP) em sistema automático de análise do sêmen (SCA- Microptic, Microptic S.L., Barcelona, Spain), os dados foram analisados pelo programa SAS (SAS Institute Inc., 2010) e submetidos à análise dos modelos mistos. Diferenças foram consideradas significativas quando p<0,05 e os resultados foram apresentados em média ± EPM. Para MT, o HT 24 apresentou melhores índices (p<0.05) quando comparados com o HT 0 e HT 32; entretanto foi estatisticamente igual (p>0.05) em relação aos outros tempos de HT (9.58 ± 5.94^c; 13.04 ± 6.33^{ab}; 16.12 ± 9.49^{ab}; 16.05 ± 9.88^{ab}; 18.91 ± 11.43^a; 13.65 ± 5.44^{ab}; 12.88 ± 9.04^{bc} para HT0, HT4, HT8, HT12, HT24, HT28, HT32 respectivamente). Para MP o HT24 foi melhor (p<0.05) quando comparado com o HT0 (5.95 ± 4.34^b; 8.36 ± 4.72^{ab}; 10.40 ± 6.94^{ab}; 10.12 ± 7.67^{ab}; 12.77 ± 8.88^a; 8.33 ± 3.86^{ab}; 8.08 ± 6.54^{ab} para HT0, HT4, HT8, HT12, HT24, HT28, HT32 respectivamente). Um tempo adequado de HT é necessário para permitir que a membrana espermática adquira componentes benéficos para sustentar a sua arquitetura lipídica, além de tornar possível a ocorrência de eventos pós-traducionais, como a fosforilação da proteína HSP70; entretanto, o HT não pode ser muito prolongado, visto que longos períodos resultam em queda de motilidade. Dessa forma, concluímos que tempos de HT entre 4 e 28 horas são benéficos para a motilidade total, e que para melhores resultados de motilidade progressiva, deve-se optar por um HT de 24 horas. Aprovado pelo CEUA/FMVZ-USP (nº 9457030915).

Palavras-chave: *Holding time* , criopreservação, sêmen, suíno, motilidade.

Keywords: *Holding time* , cryopreservation, semen, boar, motility.

Agradecimentos: Fapesp 2015/17620-7 e 2016/09441-8.



A fluidez da membrana plasmática dos espermatozoides suínos é afetada por diferentes tempos de *holding time*?

The plasma membrane fluidity of swine spermatozoa is affected by different times of holding time?

Bruno Bracco Donatelli Muro¹, Matheus Saliba Monteiro¹, Mariana Andrade Torres¹, Rafaella Fernandes Carnevale¹, Simone Maria Massami Kitamura Martins¹, Marina da Silva Passarelli¹, Frederico Ozanan Papa², Marco Antônio Alvarenga², José Antônio Dell' Aqua Junior², Flávio Vieira Meirelles³, André Furugen Cesar de Andrade^{1,*}

¹Núcleo de Pesquisa em Suínos, FMVZ/USP, SP, Brasil; ²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, SP, Brasil; ³Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, USP, Pirassununga, SP, Brasil.

*E-mail: andrefc@usp.br

Durante a criopreservação do sêmen ocorrem diversos eventos semelhantes a capacitação espermática. Durante essa criocapacitação, uma das alterações observadas na célula espermática é o aumento da fluidez da membrana plasmática. O espermatozoide suíno apresenta-se mais susceptível a esses eventos, devido as particularidades de sua membrana. Submeter os espermatozoides de suínos a um contato estendido com o próprio plasma seminal (à 17 °C) previamente a criopreservação, processo esse denominado *Holding Time* (HT), tem se mostrado eficiente para estabilizar componentes da membrana plasmática. Entretanto o tempo ideal ainda não foi estabelecido. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a influência de diferentes tempos de HT sobre a fluidez de membrana do espermatozoide suíno submetido à criopreservação. Foi realizada a coleta da fração rica de 3 ejaculados de 5 cachos (n=15). Depois de realizadas as análises *in natura*, o sêmen foi diluído em BTS na proporção 1:2 (sêmen:diluidor) e então divididos nos seguintes tempos de Holding Time: HT 0 (0 hrs), HT 4 (4 hrs), HT 8 (8 hrs), HT 12 (12 hrs), HT 24 (24 hrs), HT 28 (28 hrs) e HT 32 (32 hrs). Após decorrido o tempo de HT as amostras foram centrifugadas (2400 g/3 min), o sobrenadante (BTS e plasma seminal) foi desprezado e o *pellet* suspenso em diluidor para congelamento de sêmen suíno à base de gema de ovo (BotuSui[®] – Botupharma Botucatu, SP, Brasil) na concentração de 600 x 10⁶ espermatozoides/mL. O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,5 ml e criopreservadas em sistema automático (TK Tecnologia em Congelamento[®], Uberaba-MG, Brasil). As amostras foram descongeladas a 37°C e as análises para fluidez de membrana foram realizadas por citometria de fluxo (BD Accuri C6-Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) através do uso das sondas Merocianina 540/YO-PRO. As amostras foram analisadas quanto à intensidade de fluorescência, captados pelo fotomultiplicador long-pass 596 e band-pass 610/20. Os dados foram analisados pelo programa SAS (SAS Institute Inc., 2010) e submetidos à análise dos modelos mistos. Diferenças foram consideradas significativas quando p<0,05 e os resultados foram apresentados em média ± EPM. Não houve diferença estatística entre os diferentes tempos de HT para a intensidade de fluorescência da Merocianina 540 (13.272,36 ± 3.169,85; 10.387,46 ± 2.309,56; 12.886,18 ± 2.520,23; 12.579,10 ± 2.344,36; 12.997,29 ± 2.466,13; 12.612,35 ± 2.286,06; 16.889,04 ± 3.314,48 para HT 0, HT 4, HT 8, HT 12, HT 24; HT 28, HT 32, respectivamente). O contato estendido dos espermatozoides com as proteínas do plasma seminal, independente do tempo de exposição, não foi capaz de estabilizar os componentes da membrana plasmática após a descongelamento. Portanto, a partir dos resultados obtidos, podemos inferir que a fluidez da membrana plasmática dos espermatozoides suínos não é afetada pelo HT.

Palavras-chave: *Holding time*, criopreservação, sêmen, suíno, fluidez de membrana.

Keywords: *Holding time*, cryopreservation, semen, boar, membrane fluidity.

Agradecimentos: Fapesp 2015/17620-7; 2016/09441-8.



Análise endócrina e morfológica do trato genital de fêmeas suínas

Endocrine and morphological evaluation of female swine genital

**Viviane Maria Codognoto*, Stephane Cássia de Oliveira Rosa Vexenat, Mariana Zorzetto,
Paulo Henrique Yamada, Eunice Oba**

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ),
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), campus de Botucatu, SP, Brasil.

*E-mail: viviane.codognoto@gmail.com

A suinocultura brasileira, a exemplo de outras cadeias do agronegócio, cresceu significativamente nos últimos anos, transformando-se uma atividade produtiva altamente tecnificada. As perdas econômicas relacionadas a alterações de fertilidade em reprodutoras suínas é um dos principais problemas enfrentados pelos sistemas de produção da suinocultura industrial. A avaliação dos órgãos reprodutivos é uma prática difícil e pouco utilizada na clínica de suínos, sendo muito importante o uso dos achados *post-mortem* de abate na identificação dos problemas reprodutivos de fêmeas. Por sua vez, alguns parâmetros reprodutivos são fortemente influenciados pelos hormônios envolvidos na reprodução. Os principais hormônios relacionados aos processos reprodutivos e, de estresse das fêmeas são progesterona, estradiol e cortisol. Estes estão envolvidos em eventos como início e desenvolvimento da puberdade, foliculogênese, gestação e outros processos essenciais à vida reprodutiva da espécie. O presente estudo teve por objetivo avaliar as concentrações plasmáticas de progesterona, cortisol e estradiol, morfometria e ocorrências de alterações do trato reprodutivo de fêmeas suínas, correlacionando-as com a faixa etária dos animais. O delineamento experimental foi Estudo Observacional Transversal: estudo não controlado, apenas o efeito clínico e as dosagens foram pesquisados na população em estudo. Foram colhidos sangue de 114 fêmeas suínas durante a sangria, para a realização de dosagens hormonais pela técnica de radioimunoensaio, e retirados o aparelho genital feminino para o estudo morfométrico. Para a análise estatística foram utilizados o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, onde foi avaliado a idade relacionando-a com as dimensões reprodutivas, e o teste de Spearman, que avaliou a correlação entre concentrações hormonais e alterações morfológicas do trato reprodutivo. A progesterona, estradiol e cortisol influenciaram nas faixas etárias de animais entre 6 a 12 meses e 37 a 60 meses para a concentração plasmáticas de progesterona e, em animais de 24 a 36 meses nas concentrações plasmáticas de cortisol. Em relação ao cortisol, a correlação foi negativa (quanto maior a concentração de cortisol, menor as dimensões do trato reprodutivo) podendo estar relacionado ao manejo de criação, segundo o teste de Kruskal-Wallis. Alterações como salpingite, agenesia de corno uterino, metrite eosinofílica, cistos endoteliais, áreas focais de fibrose também foram identificadas e analisadas pelo método Mann-Whitney. Uma das alterações encontradas com maior frequência nos ovários foram cistos ovarianos. Os achados do presente estudo revelaram que a incidência de cistos em tuba uterina e infundíbulo (38,6%) foram maiores do que o aparecimento de cistos ovarianos sendo estes encontrados principalmente em animais mais velhos. Concluímos que a idade influenciou significativamente com praticamente todas as características morfológicas reprodutivas e, portanto, ela deve ser levada em consideração na análise da relação entre concentração hormonal e características reprodutivas. Já as concentrações plasmáticas de progesterona, estradiol e cortisol influenciaram nas faixas etárias de animais entre 6 a 12 meses e somente a progesterona exerceu influencia entre 37 a 60 meses, e o cortisol para animais de 24 a 36 meses.

Palavras-chave: matriz suína, morfometria, cortisol, estradiol, progesterona.

Keywords: *swine matrix, morphometry, cortisol, estradiol, progesterone.*



Imunolocalização de proteínas relacionadas ao processo espermatogênico em suínos *Immunolocalization of proteins during spermatogenic process in pigs*

Naira Caroline Godoy Pieri^{1,*}, Aline Fernanda Souza², Daniele dos Santos Martins², Flávio Vieira Meirelles², Fabiana Fernandes Bressan², André Furugen Cesar Andrade¹

¹Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP, Brasil; ²Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil.

*E-mail: nairagodoy@gmail.com

A linhagem de células germinativas nos mamíferos é composta por células com capacidade de autorrenovação e diferenciação. Estas células são formadas na espermatogênese, que é um processo extremamente complexo de diferenciação celular. As células tronco espermatogoniais (SSCs) que são de extrema importância para este processo, vem sendo estudadas *in vivo* com intuito de compreender os nichos que estão inseridas, além de serem usadas em pesquisas com modelo para o tratamento de infertilidade. Entretanto, poucos estudos têm investigado os mecanismos de expressão proteica das células germinativas *in vivo e in vitro* em suínos, assim uma melhor caracterização destas células é necessária. Desta forma, o objetivo deste estudo foi caracterizar a expressão de proteínas que participam da espermatogênese nos testículos de suínos adultos usando análise morfologia e a imunohistoquímica. Os testículos foram obtidos durante o processo de castração de 4 suínos. As amostras de tecido testicular foram fixadas (paraformol 4%), emblocados em parafina, cortados em secções de 3µm e as lamínas coradas com hematoxilina e eosina. Foi também realizada a imunofluorescência para os anticorpos DAZL (1:100), VASA (1:500), PLZF (1:100) e OCT4 (1:100) (sc27333; Sc67185, sc22839; sc8629 Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) e STRA8 (1: 100) (ab49602, Abcam, Cambridge, UK). A análise histológica mostrou que os testículos avaliados apresentavam espermatogênese completas com: espermatogônias, espermatócitos, espermatídes e espermatozoides. A proteína PLZF foi detectada em espermatogônias localizadas próximas a membrana basal, mostrando que esta proteína está ligada ao processo de autorrenovação e manutenção das células tronco. As proteínas DAZL e STRA8 foram detectadas em espermatogônias diferenciadas localizadas próximas a membrana basal dos túbulos e espermatídes, respectivamente. Estas proteínas, estão envolvidas nas fases de diferenciação e foram detectadas em células germinativas na fase pré-meiótica. Também foi avaliada a co-imunolocalização destas duas proteínas, e foi observado que alguns espermatócitos primários, apresentavam-se DAZL e STRA8 positivos. Houve a detecção de VASA em algumas espermatogônias e espermatócitos primários, mas não em espermatídes arredondas. Todas as células germinativas VASA positivas, nos testículos dos suínos avaliados foram negativas para OCT4, que é uma proteína ligada a pluripotencialidade e detectada nos testículos em SSCs. Nossos achados sugerem que os mecanismos fisiológicos e o nicho que mantém o processo espermatogênico é conservado entre os mamíferos. A identificação das proteínas PLZF, DAZL, STRA8 e VASA no presente estudo providencia um primeiro passo para futuras pesquisas sobre autorrenovação, diferenciação e a compreensão do nicho das células tronco espermatogoniais *in vivo*, além de auxiliar no sucesso de estudos de transplante destas células como modelo para a infertilidade.

Palavras-chave: espermatogônias, células tronco, proteínas.

Keywords: *spermatogonial, stem cells and protein.*



Resposta às condições capacitantes reflete a influência do plasma seminal sobre a integridade das membranas plasmática e acrossomal no sêmen suíno refrigerado

Response to capacitating stimuli indicates influence of seminal plasma on plasma and acrosome membrane integrity of boar extended semen

Ana Paula Pinoti Pavaneli*, Marina da Silva Passarelli, Flávia Vieira de Freitas, Gisele Mouro Ravagnani, Mariana Andrade Torres, Simone Maria Massami Kitamura Martins, André Furugen Cesar de Andrade

Núcleo de Pesquisa em Suínos - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), USP, Pirassununga, SP, Brasil.

*E-mail: anap.pavaneli@gmail.com

A integridade da membrana plasmática (MP) é uma das características de maior importância para a viabilidade do espermatozoide. Durante a capacitação espermática, sua conformação estrutural é alterada, o que a torna mais fluida e permeável a íons presentes no meio, como o bicarbonato e o cálcio, culminando com uma cascata de eventos precedentes à fertilização, entre eles a reação acrossomal (RA). O plasma seminal (PS) contém fatores, como as proteínas espermadesinas, responsáveis por manter a estabilidade da MP e inibir a capacitação e RA dos espermatozoides. Por este motivo, o PS tem se mostrado eficiente na conservação da célula espermática durante a refrigeração, impedindo que eventos como os citados acima ocorram de forma precoce. Entretanto, sabe-se que, *in vitro*, o PS pode atuar de forma benéfica ou deletéria sobre esta célula, dualidade esta que talvez possa ser explicada em função da variação existente na composição do PS entre ejaculados de animais diferentes bem como entre os ejaculados de um mesmo animal. No presente estudo, doses inseminantes foram preparadas a partir da fração rica de 24 ejaculados, provenientes de 4 coletas de cada um dos 6 cachos utilizados, refrigeradas (15-17°C) por 72 horas na presença do PS (CPS) ou na ausência deste (SPS), e então incubadas à 38,5°C à 5% CO₂, tanto em meio capacitante (CM) como em meio não capacitante (NCM), originando quatro tratamentos: CPS CM, CPS NCM, SPS CM e SPS NCM. As análises aconteceram nos tempos 0 (10 minutos), 2 e 4 horas após incubação, nas quais avaliou-se simultaneamente a integridade das membranas plasmática e acrossomal por citometria de fluxo com o uso das sondas fluorescentes Syto 59, Iodeto de Propídio e FITC-PSA. Dentre as categorias celulares obtidas através desta análise, elegeu-se para estudo aquelas compostas por células AIMI (acrossoma íntegro e membrana plasmática íntegra) e ARMI (acrossoma reagido e membrana plasmática íntegra), as quais não apresentaram efeito de interação entre os três fatores avaliados: plasma, meio e tempo ($p > 0,05$). Entretanto, observou-se efeito individual de meio e tempo ($p < 0,05$) para AIMI, sendo representada em menor porcentagem quando incubada em CM (CM: $27,71 \pm 1,34$; NCM: $35,43 \pm 1,27$), e em maior porcentagem quando avaliada no tempo 0 (T0: $41,10 \pm 1,73$; T2: $27,86 \pm 1,35$; T4: $25,76 \pm 1,38$), respectivamente. Já para ARMI, observou-se interação entre meio e tempo ($p < 0,05$), além de efeito individual de plasma ($p < 0,05$), ilustrados pela presença de um maior porcentagem destas células em CM em todos os tempos de análise (CM T0: $19,38 \pm 1,39$, CM T2: $16,28 \pm 1,14$, CM T4: $20,37 \pm 1,28$; NCM T0: $10,22 \pm 1,08$, NCM T2: $10,72 \pm 1,05$, NCM T4: $10,78 \pm 1,03$), e quando incubada na presença do PS (CPS: $16,38 \pm 0,73$; SPS: $12,87 \pm 0,76$), respectivamente. Com estes resultados, comprova-se a eficácia do CM em promover a capacitação espermática, uma vez observada uma maior ocorrência de reação acrossomal neste meio. Além disso, pode-se concluir com o presente trabalho, que a presença do PS durante a refrigeração do sêmen suíno foi benéfica para a integridade da membrana plasmática, não sendo, entretanto, capaz de prevenir a ocorrência da reação acrossomal.

Palavras-chave: plasma seminal; capacitação; sêmen suíno refrigerado.

Keywords: seminal plasma; capacitation; boar extended semen.



Seasonal variation in activity of enzymatic antioxidant scavengers in boar semen

Varição sazonal da atividade de agentes antioxidantes no sêmen suíno

Laura Espíndola Argenti¹, Belisa Parmegginani², Guilhian Leipnitz², Ivan Cunha Bustamante-Filho^{1,*}

¹Laboratório de Biotecnologia, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Univates, Lajeado, RS, Brasil; ²Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

*E-mail: ivanbustamante@univates.br

Boar semen production is clearly affected by season and oscillation production of semen doses raises concern due to impact in profitability. Annual variations in temperature and photoperiod are the most important factors involved and result in significant physiological changes in the boar. Decrease in sperm motility and total sperm production could be explained by an increase of oxidative stress in the testis and epididymis, as well as during liquid storage of semen doses as a result of a reduction in sperm antioxidant protection. Thus, the aim of this study was to verify if the activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) in swine seminal plasma and spermatozoa varied throughout the year. Semen samples of nine boars were collected between May 2015 and April 2016. Twice per season, routine seminal analyses were performed together with SOD and GPx activities in seminal plasma and spermatozoa. Sperm concentration was the only fresh semen parameter that presented a seasonal variation, with higher values in autumn and winter ($P < 0.05$). Among the parameters evaluated after 120 h of preservation at 17°C, rapid motility was the only parameter influenced by seasonality, presenting higher values in ejaculates collected during the summer ($P < 0.05$). GPx activity presented an annual mean of 7.08 U/mg protein and 3.28 U/mg protein in spermatozoa and seminal plasma, respectively. SOD activity had an annual mean of 11.72 U/mg protein in sperm protein extract and 5.28 U/mg protein in seminal plasma. Despite showing no variation in seminal plasma, sperm SOD activity was higher during spring and summer ($P < 0.05$). In ejaculates collected during autumn, the activity of SOD in spermatozoa was inversely associated with the variations in total motility after 120h of storage at 17°C ($R = 0.45$; $P = 0.0022$). In spring samples, GPx activity in seminal plasma was also correlated, although poorly, with total motility after 5 days of cold storage ($R = 0.24$; $P = 0.0369$). The management of the boar stud farm could explain the findings of this study. Together with a correct semen collection routine, animal welfare practices, heat stress control and balanced nutrition, the administration of vitamin supplementation during the whole experiment period could have contributed to the absence of a marked season effect on the parameters evaluated. In conclusion, we observed little influence of seasonality in boar seminal parameters and seminal plasma and sperm GPx and SOD activities in the conditions tested.

Keywords: superoxide dismutase, glutathione peroxidase, swine, semen, preservation.

Palavras-chave: *superóxido dismutase, glutathione peroxidase, suíno, sêmen, preservação.*

Financial support: CAPES, FAPERGS, CNPq, FUVATES.