



Protocolos e possibilidades de criopreservação de sêmen suíno

Protocols and possibilities for cryopreservation of boar semen

André Furugen Cesar de Andrade[‡], Ana Carolina Pedrosa, Marina da Silva Passarelli,
Simone Maria Massami Kitamura Martins

Núcleo de Pesquisa em Suínos, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil.

Resumo

A criopreservação do sêmen pode ser considerada uma das principais biotecnologias da reprodução animal, uma vez que, proporciona ampla difusão genética de animais superiores, a elaboração de bancos de germoplasma, bem como, maior biossegurança seminal, promovendo grande impacto na cadeia de produção mundial. Contudo, quando se refere à espécie suína, esta biotecnologia ainda é pouco empregada, sendo responsável por não mais que 1% das inseminações artificiais realizadas. Devendo-se, principalmente, aos danos causados durante a criopreservação, fato este relacionado, a grande variação na congelabilidade entre indivíduos, impossibilitando a utilização de tal ferramenta a nível comercial. Diante do exposto, o presente estudo visa evidenciar as diversas vertentes que estão sendo exploradas, a fim obter melhorias na qualidade do sêmen congelado de suínos e consequentemente, tornar possível a utilização deste a nível comercial.

Palavras-chave: espermatozoides, cachorros, biotecnologia, criotolerância.

Abstract

Semen cryopreservation may be one of the main biotechnologies of animal reproduction since it provides wide genetic diffusion of superior boars, creation of germplasm bank, as well as improving semen biosecurity, promoting a great impact on global production. However, regarding swine, this biotechnology is still little used, accounting for no more than 1% of the artificial inseminations. This is mainly due to injuries caused during cryopreservation process, and related to the great variability in the semen freezeability between the individuals, making it impossible in commercial use. In this way, the present study aims to highlight the various aspects that are being explored, in order to achieve improvements in the quality of frozen boar semen and consequently make it possible to use it commercially.

Keywords: spermatozoa, boars, biotechnology, cryotolerance.

Introdução

É incontestável que a criopreservação é a biotecnologia mais apropriada para promover o armazenamento de sêmen suíno por um longo período de tempo, sendo esta ainda, responsável por inúmeros benefícios quando relacionada à maior biossegurança, flexibilidade de uso e ampla difusão genética (Rodríguez-Gil e Estrada, 2013; Knox, 2015). Entretanto, sabe-se que na suinocultura moderna, o uso do sêmen criopreservado é pouco empregado, sendo utilizado em apenas 1% das inseminações artificiais realizadas, não condizendo com o elevado investimento que a ciência mundial tem implementado para a melhoria da criopreservação dos espermatozoides na espécie suína (Roca et al., 2011).

Inúmeros estudos têm demonstrado que o baixo uso do sêmen suíno congelado deve-se ao fato de que este apresenta redução nas taxas de concepção e está associado a leitegadas menores (2-3 leitões em média), sendo tais resultados atribuídos aos danos de estrutura e funcionalidade da célula espermática, causados durante o processo de criopreservação (Khalifa et al., 2014). Tais danos estruturais, não estão limitados apenas à membrana plasmática da célula espermática, mas também, são responsáveis por comprometer a integridade da cromatina e a função mitocondrial, envolvendo ainda, a degradação de mRNAs, agindo de forma prejudicial sobre a ação de importantes proteínas (Yeste, 2016).

Com o intuito de obter melhorias quanto à congelabilidade do sêmen suíno, diversas alterações nos protocolos de criopreservação têm sido elaboradas, promovendo o uso de frações específicas do ejaculado, a remoção ou adição de plasma seminal, adição de antioxidantes e *holding time* (HT) (Holt et al., 2005; Saravia, 2010; Alkmin et al., 2014; Tomás et al., 2014; Yeste et al., 2014a). Entretanto, tais alternativas ainda apresentam resultados inconsistentes, sendo estes atribuídos à grande variabilidade na qualidade do sêmen congelado entre cachorros (Roca et al., 2006).

Diante do exposto, o presente trabalho visa elucidar sobre o que tem sido realizado na última década quanto

[‡]Correspondência: andrefc@usp.br

Recebido: 21 de dezembro de 2018

Aceito: 8 de maio 2019



à criopreservação de sêmen na espécie suína e evidenciar as inúmeras possibilidades que podem ser executadas, no intuito de promover melhorias na congelabilidade de tais células espermáticas, tendo em vista a relevância desta biotecnologia no cenário da suinocultura nacional e internacional.

Particularidades do ejaculado suíno

Considerado como a característica fisiológica reprodutiva de distinção das demais espécies, o elevado volume ejaculado pelos suínos (200 a 400 mL) constitui um ponto interessante, uma vez que sua centrifugação se torna necessária, a para obtenção de uma concentração significativa de espermatozoides, visando a criopreservação seminal (Carvajal et al., 2004).

Outro aspecto interessante, relaciona-se à distinção macroscópica das diferentes frações desse ejaculado. A fração inicial, denominada como fração pré-espermática (PSF), é composta por secreções oriundas da próstata, apresentando-se como um fluido translúcido, que ajuda a eliminar o acúmulo de urina, tal como qualquer tipo de sujidade retida no canal uretral. Na sequência, a observação da fração espermática ou também conhecida como fração rica (FE ou FR) será evidente, devido à sua coloração leitosa e seu aspecto viscoso, correspondentes à elevada concentração de espermatozoides, além de fluidos epididimário e uma discreta secreção das glândulas sexuais acessórias. Ainda nesta fração, os pulsos ejacutórios conhecidos como *sperm-peak portion*, fazem referência aos dez pulsos iniciais então ejacutados nesta fase. A terceira fração ejacutada, a fração pós-espermática (PSRF), caracteriza-se por uma baixa concentração espermática, contendo um elevado volume de plasma seminal. Já a quarta fração, conhecida como fração gelatinosa (FG), oriunda das glândulas bulbouretrais, possui uma importante função apenas nos casos de monta natural, quando atua no tamponamento da cérvix, evitando o refluxo seminal (Rodríguez-Martínez e Wallgren, 2011; Alkmin et al., 2014; Yeste, 2016).

Protocolos para a criopreservação

A criopreservação seminal consiste em um conjunto de processos, que envolvem coleta do ejaculado, diluição, refrigeração, criopreservação, armazenamento a -196°C e descongelação (Hammerstedt et al., 1990). Os baixos índices reprodutivos observados diante a utilização do sêmen suíno criopreservado devem-se a um conjunto de danos que ocorrem durante cada um destes processos, os quais acarretam em uma redução da capacidade funcional dos espermatozoides e até mesmo a sua inviabilidade (Watson, 2000).

Desta forma, inúmeros estudos avaliaram diferentes técnicas na tentativa de promover melhorias sobre a congelabilidade do sêmen suíno, que, em conjunto, determinam os protocolos básicos para criopreservação do sêmen suíno (Saravia et al., 2010; Casas e Althouse, 2013; Fernández-Gago et al., 2013; Tomás et al., 2014; Vilagran et al., 2015; Torres et al., 2016).

Particularidades do ejaculado e dos espermatozoides suínos

Os espermatozoides suínos possuem particularidades em relação à composição da sua membrana plasmática, em que há baixas concentrações de fosfatidilcolina e altas porcentagens de fosfatidiletanolamina e esfingomiélin. Os ácidos graxos dos fosfolípidios de membrana por sua vez, determinam o comportamento da fase de transição lipídica da membrana plasmática (Johnson et al., 2000), uma vez que cada tipo de lipídeo de membrana apresenta uma temperatura específica de transição. Assim, com a redução da temperatura os lipídeos de semelhante estruturação se agrupam e em alguns casos, de forma irreversível, formam as denominadas “balsas lipídicas”, as quais, conseqüentemente, alteram as características funcionais da membrana plasmática (Watson, 2000).

O colesterol, componente também encontrado em reduzidas concentrações nas membranas biológicas do espermatozoide suíno, influencia de forma significativa na formação de tais balsas, o que torna a célula mais sensível ao choque pelo frio, devido às alterações na fluidez da membrana plasmática, levando precocemente à transição de fases do estado líquido para o estado gel (Johnson et al., 2000).

A utilização da *sperm-peak portion* para o processo de criopreservação seminal em suínos é a mais indicada, quando comparada ao uso da fração total deste ejaculado. Isso se deve à resistência ao choque pelo frio dos espermatozoides presentes nesta fração, considerando o atraso ao evento de reação acrossomal e uma maior estabilidade das membranas biológicas, gerando uma maior viabilidade pós-descongelação (Saravia et al., 2010).

O plasma seminal é considerado um meio complexo, com uma série de componentes orgânicos e inorgânicos, como os aminoácidos, proteínas em especial, íons, frutose, sorbitol, inositol, bicarbonato, substâncias antimicrobianas, lipídios, e uma série de substâncias hormonais. Sendo assim acaba por exercer um importante papel sobre o metabolismo celular durante este processo (Caballero et al., 2008; Vadnais; Roberts, 2010; Aitken e Nixon, 2013; Yeste et al., 2014a).

Holding time

A associação dos espermatozoides com as moléculas do plasma seminal mostra-se de suma importância após a ejaculação, pois atuarão de forma direta mediante à formação dos reservatórios espermáticos à indução da



capacitação, no processo de fertilização, atuando, também, em outras vias metabólicas. A adesão dessas moléculas na superfície da membrana plasmática auxilia no transporte das mesmas até seu sítio de ação, bem como protegem os espermatozoides durante o seu trajeto (Töpfer Petersen et al., 2005; Rodríguez-Martínez et al., 2011; Gómez-Fernández et al., 2012; Chen et al., 2015; Kumar et al., 2015).

Uma alternativa eficaz e indispensável para contornar os resultados insatisfatórios da criopreservação do sêmen suíno é a aplicação do denominado *holding time* (HT) (“tempo de espera”). Tal evento é caracterizado pelo período de contato das células espermáticas com o seu próprio plasma seminal, tal como com diluidores destinados a refrigeração (BTS - Beltsville Thawing Solution), a uma temperatura de 17°C, durante períodos pré-determinados (Ohata et al., 2001). No caso do espermatozoide suíno, o processo de criopreservação normalmente é realizado após 24 horas de *holding time*, o que permite uma maior interação entre a célula e o plasma seminal, garantindo uma maior criotolerância. Contudo, apesar da sua aplicabilidade ser bem difundida, existem ainda diversidades quanto aos períodos aplicados (Guthrie e Welch, 2005; Casas; Althouse, 2013; Tomás et al., 2014; Yeste et al., 2014b; Torres et al., 2019, no prelo).

Metodologias: One-step x Two-steps

Ao considerarmos a adição do crioprotetor, o momento no qual este será adicionado refere-se à principal distinção entre o protocolo de criopreservação em uma etapa (*One-step*) e o protocolo em duas etapas (*Two-steps*), sendo considerado como passo fundamental para a garantia da viabilidade espermática (Silva et al., 2006). Nos protocolos *One-step*, o diluidor contendo o crioprotetor de interesse deve ser adicionado ao sêmen a temperatura de 37°C, permanecendo sob as curvas de refrigeração e criopreservação, respectivamente. Já a metodologia *Two-steps* conta com um diluidor inicial (Fração A), desprovido de crioprotetor, que permanecerá durante toda a curva de refrigeração até 5°C, sendo sequencialmente adicionado mais diluidor, porém agora, contendo o crioprotetor (Fração B). Em seguida, esta mistura é direcionada à curva de criopreservação (Peña et al., 1998).

O protocolo de *One-step* pode apresentar vantagens como a rapidez da sua execução, praticidade e baixos custos, além da redução do número de equipamentos necessários para o seu processamento, tornando, assim, a criopreservação de sêmen suíno mais vantajosa para a sua aplicação em larga escala. Sabe-se que a criopreservação, segundo essa metodologia, pode não modificar os índices de viabilidade espermática pós-descongelamento em outras espécies (Peña et al., 1998; Silva et al., 2006; Brito et al., 2016). Entretanto, para suínos, poucos estudos foram realizados, elucidando qual seria a melhor metodologia a ser aplicada e com bons resultados pós-descongelamento, além da criação de protocolos simples, baratos, facilitando a criopreservação em larga escala do sêmen suíno.

Concentração espermática nas palhetas e métodos de envase

A concentração espermática nas palhetas, tal como os métodos de envase para criopreservação do sêmen suíno, são pontos de suma importância para a obtenção do sucesso, e que possuem uma estrita relação com a sobrevivência destas células.

A ideia de que altas concentrações espermáticas possam ser úteis a fim de elevar o número de espermatozoides viáveis no aparelho reprodutivo das fêmeas suínas já foi estudada, e mostrou-se inaplicável, uma vez que se observa a inviabilidade dos mesmos perante o comprometimento dos parâmetros de cinética espermática (Alvarez et al., 2012). Ravagnani et al. (2018) observaram que amostras criopreservadas com até 300×10^6 espermatozoides/mL, em palhetas de 0,5 mL, apresentaram melhores resultados quanto à viabilidade, devido à maior disponibilidade dos agentes crioprotetores para cada célula, quando comparadas às amostras com concentrações superiores (600×10^6 e 800×10^6 espermatozoides/mL). Desta forma, os autores concluíram que quanto maior a quantidade de crioprotetor por célula, maior a porcentagem de células viáveis ao considerar a cinética e a manutenção dos diferentes compartimentos estruturais destas células.

Pesquisas comprovaram que a qualidade espermática pós-descongelamento sofre grande influência do fator armazenagem, conjuntamente à concentração. Assim, o sêmen de cachaaos pode ser processado em palhetas plásticas de diferentes volumes, como palhetas de 0,25 e 0,5 ml (Jhonson et al., 2000) ou maxipalhetas de 5 ml (Weitze et al., 1987), ou nas chamadas “*FlatPacks*”, responsáveis pela armazenagem de até 5 mL de sêmen criopreservado (Erikson e Rodríguez-Martínez, 2000). Estas últimas mostram ter ampla aplicação, assim como as palhetas de 0,25 e 0,5 mL. Atualmente, grande parte dos protocolos de criopreservação apresentados na literatura utilizam palhetas de 0,5 mL, com concentração espermática de 500×10^6 espermatozoides/mL (Casas et al., 2009; Yeste et al., 2013a; 2013b).

Tempo de Equilíbrio

Como já apresentado, sabe-se que as membranas dos espermatozoides devem passar por fases de transição durante a refrigeração e descongelamento. Ao considerarmos a curva de refrigeração, à temperatura de 5°C iniciam-se os eventos de alterações na membrana plasmática, cuja transição do estado normal líquido para o estado de gel é o evento marcante desta etapa (Mazur, 1984). Salamon e Maxwell (2000) definiram o tempo de equilíbrio como o período total em que os espermatozoides são mantidos em contato com todos os componentes do diluidor,



previamente à congelação, a uma temperatura de 5°C, garantindo um equilíbrio osmótico entre o meio intra e extracelular, impulsionado por todos os componentes osmoticamente ativos presentes no diluidor. Contudo, tal afirmação nunca foi comprovada em nível molecular, sabendo-se apenas da sua ação positiva perante às características de motilidade espermática e integridade de membranas plasmática e acrossomal.

Desde a década de 1950, o tempo de equilíbrio vem sendo estudado como uma forma de melhora no processo de criopreservação espermática, sendo aplicado para diferentes espécies (Polge; Rowson, 1952; Martin, 1963; Wiggin; Almquist, 1975; Fiser et al., 1996; Brisko et al., 2000; Bittencourt et al., 2006; Leite et al., 2010; Du Bois et al., 2012; Pugliesi et al., 2012; Belala et al., 2016).

Na espécie suína, estudos já buscaram por resultados positivos para a aplicação do tempo de equilíbrio, devido justamente aos desafios característicos da espécie. Fiser et al. (1996) testaram diferentes concentrações de glicerol (0, 2, 4, 6% v/v) associadas a diferentes tempos de equilíbrio (6 e 30 minutos, 1, 2, 4 e 24 horas), em palhetas de 0,5 mL, estando ausente a aplicação do então denominado *holding time*. Foi identificado que nos períodos de 2 e 4 horas de tempo de equilíbrio, apresentou-se as maiores porcentagens de espermatozoides móveis pós-descongelação, além de um aumento na integridade do acrossoma no período de 4 horas, quando comparado aos demais tempos.

Casas e Althouse (2013), demonstraram que a exposição dos espermatozoides ao seu próprio plasma seminal sob um período de 24 horas minimizou as alterações comumente visíveis nos casos de criopreservação, quando associados a 5°C sob dois diferentes tempos de equilíbrio (3 e 24 horas), obtendo desta forma, uma melhora na criotolerância em ambos. Tal trabalho representa evidências empíricas de que a relação do HT com o tempo de equilíbrio apresenta, de forma significativa, modificações benéficas na membrana plasmática dos espermatozoides suínos. Com objetivos semelhantes, Passarelli et al. (2018, em elaboração), encontram-se testando novos períodos de tempos de equilíbrio (0, 2 e 4 horas), sob o protocolo de *two-steps* e HT de 24 horas, onde pretendem avaliar um maior número de variáveis, buscando compreender o efeito deste protocolo perante os seus aspectos fisiológicos e morfológicos, relacionados à integridade da membrana plasmática, à cinética do movimento da célula e à morfometria da cabeça do espermatozoide.

Possibilidades para os protocolos de criopreservação do sêmen suíno

Na última década, inúmeros estudos empregaram diversas técnicas na tentativa de promover melhorias sobre a congelabilidade do sêmen suíno, realizando a retirada ou adição de plasma seminal (Saravia et al., 2009; Gómez-Fernández et al., 2012; Fernández-Gago et al., 2013; Torres et al., 2016), adição de antioxidantes (Yeste et al., 2014^a), uso de frações específicas do ejaculado (Saravia et al., 2010; Vilagran et al., 2013) e *holding time* (Casas e Althouse, 2013; Tomás et al., 2014). Entretanto, todas as alternativas mostraram pouca consistência; o que pode ser consequência da grande variabilidade que existe na qualidade pós-descongelação do sêmen suíno ou do protocolo de criopreservação utilizado (Holt et al., 2005; Roca, 2006).

As pesquisas mais recentes no contexto da andrologia suína têm focado em análises avançadas ultraestruturais do espermatozoide frente aos diversos desafios para sua criopreservação, visando compreender o real motivo dos danos causados. Nesse sentido, as análises moleculares de compostos como DNA (ácido desoxirribonucleico), RNA (ácido ribonucleico), proteínas, lipídios, vesículas extracelulares, e outros, têm esclarecido diversas dúvidas relacionadas aos diferentes resultados encontrados em pesquisas e no mercado (Yeste, 2016).

Dentre as moléculas recentemente estudadas, destacam-se os micro-RNAs, uma família de transcritos do genoma, responsáveis pela regulação pós-transcricional das inúmeras vertentes metabólicas dos organismos (Miller e Ostermeier, 2006; Boerke et al., 2007; Anderson e Kedersha, 2009; Dadoune, 2009; Mciver et al., 2012; Kotaja, 2014; Yadav e Kotaja, 2014). São moléculas de pequeno tamanho, podendo ser expressas em diferentes fases da espermatogênese, e que vêm sendo relacionadas a determinados padrões de motilidade e morfologia celulares (Curry et al., 2011), diferentes graus de criotolerância, apoptose celular (Zhang et al., 2015; Zhang et al., 2017) e doenças, como os diferentes tipos de câncer (Wang et al., 2015).

Os micro-RNAs podem ser transportados nos fluidos corporais na forma livre ou através de vesículas extracelulares de 40 – 100 nm, denominadas exossomos (Chevillet et al., 2014). Os exossomos são produzidos nos mais diversos fluidos dos organismos e são responsáveis pelo transporte das diferentes substâncias produzidas, assim como pequenos RNAs não codificantes, como os micro-RNAs (Vojtech et al., 2014; Machtinger et al., 2016). Estes exossomos podem ser secretados pelos órgãos reprodutivos do macho, justificando a importância da pesquisa do perfil de micro-RNAs do plasma seminal, buscando o entendimento da contribuição dos micro-RNAs para a criopreservação do sêmen suíno (Vojtech et al., 2014; Chen et al., 2017).

Diversos estudos estão sendo conduzidos objetivando promover o maior entendimento sobre o papel das proteínas na criotolerância dos espermatozoides de suínos (Guimarães et al., 2017). Acredita-se que em cada etapa do processo de criopreservação ocorram mudanças substanciais no proteoma espermático, resultando na degradação proteica, em alterações na localização de proteínas (quando comparado ao sêmen *in natura*) e, ainda, em modificações na função de tais moléculas. Tais alterações estão diretamente associadas à menor qualidade e capacidade de fertilização das células espermáticas dos suínos (Bogle et al., 2016; Chen et al., 2014).

Além das referidas moléculas, tem-se buscado esclarecer sobre a lipidômica dos espermatozoides suínos



criopreservados, uma vez que, os lipídeos presentes na membrana plasmática destas células *in natura*, possuem importante papel quanto à fluidez da membrana, motilidade, morfologia e viabilidade espermática. Diante disto, sabe-se apenas, que o processo de criopreservação pode promover relevantes alterações na fluidez da membrana plasmática, resultando em modificações do perfil lipídico nos espermatozoides da espécie suína, tornando-os mais sensíveis ao choque térmico (Am-In et al., 2011; Lee et al., 2015).

Por fim, deve-se ressaltar que vários componentes orgânicos e inorgânicos podem estar associados à criotolerância do sêmen de suínos e, conseqüentemente, à capacidade de fecundação, haja vista que, o metabolismo dos espermatozoides ainda é pouco compreendido. Dessa forma, é de suma importância realizar mais análises metabólicas do ejaculado suíno, visando solucionar esta problemática (Marin et al., 2003).

Torna-se evidente que inúmeros estudos ainda podem ser executados, visando promover maior entendimento quanto aos danos causados à célula espermática dos suínos durante o processo de criopreservação e, conseqüentemente, propiciar melhorias quanto à qualidade do sêmen congelado destes animais. A fim de contribuir positivamente com os demais trabalhos que estão sendo realizados, Pedrosa et al. (2019, em desenvolvimento) e Torres et al. (2019, em desenvolvimento), estão realizando estudos nos quais visam descrever e validar o perfil dos micro-RNAs, proteômica, lipidômica e metabômica do sêmen suíno com diferentes congelabilidades, na tentativa de relacionar as referidas moléculas como biomarcadores moleculares de tolerância a congelabilidade.

Considerações finais

Considerando os relevantes benefícios que o uso de sêmen criopreservado de suínos poderia fornecer ao cenário da suinocultura moderna, torna-se imprescindível compreender os reais danos causados às células espermáticas desta espécie, através da realização de mais pesquisas e, assim, conceder recursos para que esta importante biotecnologia possa ser, de fato, empregada em nível comercial. Não obstante, acredita-se que, uma vez comercialmente implementada, a criopreservação do sêmen suíno poderá induzir a uma maior utilização da Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) nos plantéis de suínos, tal como ocorre com a espécie bovina. Resultando em, ainda mais, tecnificação para a indústria suinícola.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processos: 2011/23484-8, 2015/14258-5, 2015/17620-7, 2016/02186-2, 2016/09441-8, 2017/10821-2, 2017/16987-0, 2017/201796-5, 2017/22088-8) pelas bolsas e auxílios concedidos; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES); e aos nossos parceiros DB Genética Suína e Agriness.

Referências

- Aitken RJ, Nixon B.** Sperm capacitation: A distant landscape glimpsed but unexplored. *Mol Hum Reprod*, v.19, n.12, p.785-793, 2013.
- Alkimin DV, Perez-Patinó C, Barranco I, Parrilla I, Vazquez JM, Martinez EA, Rodríguez-Martínez H, Roca J.** Boar sperm cryosurvival is better after exposure to seminal plasma from selected fractions than to those from entire ejaculate. *Cryobiology*, v.69, p.203-210, 2014.
- Alvarez M, Tamayo-Canul J, Anel E, Boixo JC, Mata-Campuzano M, Martinez-Pastor F, Anel L, De Paz P.** Sperm concentration at freezing affects post-thaw quality and fertility of ram semen. *Theriogenology*, v.77, p.1111-1118, 2012.
- Am-ina N, Kirkwoodb RN, Techakumphua M, Tantasuparuka, W.** Lipid profiles of sperm and seminal plasma from boars having normal or low sperm motility. *Theriogenology*, v.75, p.897-903, 2011.
- Anderson P, Kedersha N.** RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nature*, v.10, p.430-436, 2009.
- Baishya SK, Biswas RK, Kadirvel G, Deka BC, Kumar S, Sinha S, Dutta DJ, Saikia GK.** Effect of conventional and controlled freezing method on the post thaw characteristics of boar spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.149, n.3-4, p.231-237, 2014.
- Belala R, Briand-Amirant L, Vinciguerra L, Tainturier D, Kaidi R, Thorin C, Michaud S, Anton M, Bencharif D.** Effect of equilibration time on the motility and functional integrity of canine spermatozoa frozen in three different extenders. *Res Vet Sci*, v.106, p.66-73, 2016.
- Boerke A, Dieleman SJ, Gadella BM.** A possible role for sperm RNA in early embryo development. *Theriogenology*, v.68, p.147-155, 2007.
- Bogle OA, Kuman K, Attardo-Parrinello C, Lewis SEM, Estanyol JM, Ballésca JL, Oliva R.** Identification of protein changes in human spermatozoa throughout the cryopreservation process. *Andrology*, p.1-13, 2016.
- Bittencourt RF, Ribeiro Filho AL, Alves SGG, Biscarde CE, Vasconcelos MF, Oba E.** O efeito do tempo de equilíbrio sobre a qualidade do sêmen caprino criopreservado. *Rev Bras Saúde Prod Anim*, v.7, p.27-37, 2006.
- Brisko SP, Van Wagner GS, Graham JK, Squires LE.** Motility, morphology and triple stain analysis of fresh, cooled and frozen-thawed stallion spermatozoa. *J Reprod Fertil*, v.56, p.111-120, 2000.



- Brito MM, Lúcio CF, Angrimani DSR, Losano JDA, Dalamazzo A, Nichi M, Vannucchi C.** Comparison of Cryopreservation Protocols (Single and Two-steps) and Thawing (Fast and Slow) for Canine Sperm. *Anim Biotechnol*, v.28, n.1, p.67-73, 2016.
- Caballero I, Vazquez JM, García EM, Parrilla I, Roca J, Calvete JJ, Sanz L, Martínez EA.** Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa. *Theriogenology*, v.70, n.8, p.1352-1355, 2008.
- Carvajal G, Cuello C, Ruiz M, Vázquez JM, Martínez EA, Roca J.** Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. *J Androl*, v.25, n.3, p.389-396, 2004.
- Casas I, Althouse GC.** The protective effect of a 17°C holding time on boar sperm plasma membrane fluidity after exposure to 5°C. *Cryobiology*, v.66, n.1, p.69-75, 2013.
- Casas I, Sancho S, Briz M, Pinart E, Bussalleu E, Yeste M, Bonet S.** Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins. *Theriogenology*, v.72, p.930-948, 2009.
- Chen X, Zhu H, Hu C, Hao H, Zhang J, Li K, Zhao X, Qin T, Zhao K, Zhu H, Wang D.** Identification of differentially expressed proteins in fresh and frozen-thawed boar spermatozoa by iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS. *Reproduction*, v.147, p.321-330, 2014.
- Chen X, Hu C, Dai J, Chen L.** Metabolomics analysis of seminal plasma in infertile males with kidney-yang deficiency: A preliminary study. *Evid Based Complement Alternat Med*, v.2015, 2015.
- Chen C, Wu H, Shen D, Wang S, Zhang L, Wang X, Gao B, Wu T, Li B, Li K, Song C.** Comparative profiling of small RNAs of pig seminal plasma and ejaculated and epididymal sperm. *Reproduction*, v.153, p.785-796, 2017.
- Chevillet JR, Kang Q, Ruf IK, Briggs HA, Vojtech LN, Hughes SM, Cheng HH, Arroyo JD, Meredith EK, Gallichotte EM, Pogosova-Agadjanyan EL, Morrissey C, Stirewalt DL, Hladik F, Yu EY, Higano CS, Tewari M.** Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. *PNAS*, v.111, p.14888-14893, 2014.
- Curry E, Safranski TJ, Pratt SL.** Differential expression of porcine sperm microRNAs and their association with sperm morphology and motility. *Theriogenology*, v.76, p.1532-1539, 2011.
- Dadoune JP.** Spermatozoal RNAs: What About Their Functions? *Micros Res Tech*, v.72, p.536-551, 2009.
- Du Bois S, Len JA, Parlevliet JM, Eilts BE.** Effects of Cooling Time on Membrane Integrity and Motility of Frozen-Thawed Canine Spermatozoa using Two Different Commercial Egg Yolk-based Extenders at Two Different Cooldown Equilibration Times. *Reprod Domest Anim*, v.47, p.278-280, 2012.
- Eriksson BM, Rodriguez-Martinez, H.** "Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in large 5ml packages (FlatPack)". *Anim Reprod Sci*, v.63, n.3-4, pp.205-220, 2000.
- Fernández-Gago R, Domínguez JC, Martínez-Pastor F.** Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: A flow cytometry study. *Theriogenology*, v.80, n.4, p.400-410, 2013.
- Fiser PS, Fairfull RW, Panish PL.** Glycerol equilibration time revisited. In: *International Conference on Boar Semen Preservation, Mariensee. Proceedings.* Berlin: Blackwell, v.3, p.141-146, 1996.
- Gómez-Fernández J, Gómez-Izquierdo E, Tomás C, González-Bulnes A, Sánchez-Sánchez R, De Mercado E.** Inclusion of seminal plasma in sperm cryopreservation of Iberian pig. *Anim Reprod Sci*, v.130, n.1-2, p.82-90, 2012.
- Guimarães DB, Barros TB, Tilburg MFV, Martins JAM, Moura AA, Moreno FB, Monteiro-Moreira AC, Moreira RA, Tonioli R.** Sperm membrane proteins associated with the boar semen cryopreservation. *Anim Reprod Sci*, v.183, p.27-38, 2017.
- Guthrie HD, Welch GR.** Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. *Theriogenology*, v.63, n.2, p.396-410, 2005.
- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan P.** Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl*, v.11, n.1, p.73-88, 1990.
- Hernández M, Roca J, Gil MA, Vázquez JM, Martínez EA.** Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability. *Theriogenology*, v.67, n.9, p.1436-1445, 2007.
- Holt WV, Medrano A, Thurston LM, Watson PF.** The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: Insights from the cryomicroscope. *Theriogenology*, v.63, p.370-382, 2005.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC.** Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, n.1-3, p.143-172, 2000.
- Khalifa T, Rekkas C, Samartzi F, Lymberopoulos A, Kousenidis K, Dovenski T.** Highlights on artificial insemination (AI) technology in the pigs. *Mac Vet Rev*, v.37, p.5-34, 2014.
- Knox RV.** The fertility of frozen boar sperm when used for artificial insemination. *Reprod Domest Anim*, v.50, p.90-97, 2015.
- Kotaja N.** MicroRNAs and spermatogenesis. *Fertil Steril*, v.101, n.6, p.1552-1562, 2014.
- Kumar A, Kroetsch T, Blondin P, Anzar M.** Fertility-associated metabolites in bull seminal plasma and blood serum: 1 H nuclear magnetic resonance analysis. *Mol Reprod Dev*, v.82, n.2, p.123-131, 2015.
- Lee YS, Lee S, Lee SH, Yang BK, Park CK.** Effect of cholesterol-loaded-cyclodextrin on sperm viability and acrosome reaction in boar semen cryopreservation. *Anim Reprod Sci*, v.159, p.124-130, 2015.
- Leite TG, Vale Filho VR, Arruda RP, Andrade AFC, Emerick LL, Zaffalon BFG, Martins JAM, Andrade VJ.** Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr



- bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Anim Reprod Sci*, v.20, p.1-4, 2010.
- Machtinger R, Laurent LC, Baccarelli AA.** Extracellular vesicles: roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation. *Hum Reprod Update*, v.22, p.182-193, 2016.
- Marin S, Chiang K, Bassilian S, Lee WNP, Boros LG, Fernández-Novell JM, Centelles JJ, Medrano A, Rodríguez-Gil JE, Cascante M.** Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. *FEBS Letters*, v.554, n.3, p.342-346, 2003.
- Martin ICA.** The influence of diluents and processing time after ejaculation on the revival of deep-frozen bull spermatozoa. *J Agric Sci*, v.61, p.55-63, 1963.
- Mazur P.** Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiology*, v.247, p.125-142, 1984.
- Mciver SC, Roman SD, Nixon B, McLaughlin EA.** miRNA and mammalian male germ cells. *Hum Reprod Update*, v.18, p.44-59, 2012.
- Miller D, Ostermeier GC.** Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod Update*, v.12, p.757-767, 2006.
- Ohata PM, Wentz I, Bernardi ML.** Viability of frozen swine semen submitted to a pre-freezing equilibrium time in the presence or absence of seminal plasma. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS*, v.29, n.2, p.123-129, 2001.
- Passarelli MS.** Avaliação dos efeitos do tempo de equilíbrio nos protocolos de criopreservação do sêmen suíno: um estudo fisiológico e morfofuncional. (Dissertação, não publicada). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ). Universidade de São Paulo (USP). São Paulo, SP, Brasil, 2019.
- Pedrosa AC.** Estudo do perfil de micro-RNAs no semen de cachos com diferentes congelabilidades. (Dissertação, não publicada). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ). Universidade de São Paulo (USP). São Paulo, SP, Brasil, 2018.
- Peña AI, Barrio F, Quintela LA, Herradon PG.** Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. *Theriogenology*, v.50, p.163-174, 1998.
- Peña FJ, Saravia F, Johannisson A, Wallgren M, Rodríguez-Martínez H.** Detection of early changes in sperm membrane integrity pre-freezing can estimate post-thaw quality of boar spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.97, n.1-2, p.74-83, 2007.
- Polge C, Rowson LEA.** Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing to 79°C. *Nature*, v.169, n.4302, p.626, 1952.
- Pugliesi G, Fürst R, Carvalho GR.** Efeito de diferentes tempos de equilíbrio na criopreservação de sêmen de garanhões. *Rev Bras Ciênc Vet*, v.19, n.3, p.172-177, 2012.
- Ravagnani GM, Torres MA, Leal DF, Martins SMMK, Papa FO, Della'Aqua Júnior JA, Alvarenga MA, Andrade AFC.** Cryopreservation of boar semen in 0.5mL straws at low spermatozoa concentration is better than high concentration to maintain sperm viability. *Pesq Vet Bras*, v.38(9), p.1726-1730, 2018.
- Roca J, Hernández M, Carvajal G, Vázquez JM, Martínez EA.** Factors influencing boar sperm cryosurvival. *J Anim Sci*, v.84, n.10, p.2692-2699, 2006.
- Roca J, Parrilla I, Rodríguez-Martínez H, Gil MA, Cuello C, Vazquez JM, Martínez EA.** Approaches towards efficient use of boar semen in the pig industry. *Reprod Domest Anim*, v.46, p.79-83, 2011.
- Rodríguez-Gil JE, Estrada E.** Artificial insemination in boar reproduction. *Boar Reproduction*, p.589-608, 2013.
- Rodríguez-Martínez H, Wallgren M.** Advances in boar semen cryopreservation. *Vet Med Int*, p.1-5, 2011. Doi:10.4061/2011/396181.
- Salamon S, Maxwell WMC.** Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, n.1-3, p.77-111, 2000.
- Saravia F, Wallgren M, Johannisson A, Calvete JJ, Sanz L, Peña FJ, Roca J, Rodríguez-Martínez H.** Exposure to the seminal plasma of different portions of the boar ejaculate modulates the survival of spermatozoa cryopreserved in MiniFlatPacks. *Theriogenology*, v.71, n.4, p.662-675, 2009.
- Saravia F, Wallgren M, Rodríguez-Martínez H.** Freezing of boar semen can be simplified by handling a specific portion of the ejaculate with a shorter procedure and MiniFlatPack packaging. *Anim Reprod Sci*, v.117, n.3-4, p.279-287, 2010.
- Silva AR, Cardoso RC, Silva LD.** Influence of temperature during glycerol addition and post-thaw dilution on the quality of canine frozen semen. *Reprod Domest Anim, Zuchthygiene*, v.41, p.74-78, 2006.
- Tomás C, Gómez-Fernández J, Gómez-Izquierdo E, De Mercado E.** Effect of the holding time at 15°C prior to cryopreservation, the thawing rate and the post-thaw incubation temperature on the boar sperm quality after cryopreservation. *Anim Reprod Sci*, v.144, n.3-4, p.115-121, 2014.
- Töpfer-Petersen E, Ekhlasi-Hundrieser M, Kischhoff C, Leeb T, Sieme H.** The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *Anim Reprod Sci*, v.89, n.1-4 SPEC. ISS., p.159-170, 2005.
- Torres MA, Ravagnani GM, Leal DF, Martins SMMK, Meirelles FV, Papa FO, De Andrade AFC.** Seminal plasma arising from the whole boar sperm-rich fraction increases the stability of sperm membrane after thawing. *J Anim Sci*, p.1-7, 2016.
- Torres MA.** Assinaturas metabólicas da influência do holding time sobre o aumento da criotolerância dos espermatozoides suínos. (Dissertação, não publicada). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ). Universidade de São Paulo (USP). São Paulo, SP, Brasil, 2019.
- Vadnais ML, Roberts KP.** Seminal plasma proteins inhibit in vitro - and cooling-induced capacitation in boar



spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*, v.22, n.6, p.893-900, 2010.

Vilagran I, Castillo J, Bonet S, Sancho S, Yeste M, Estanyol JM, Oliva R. Acrosin-binding protein (ACRBP) and triosephosphate isomerase (TPI) are good markers to predict boar sperm freezing capacity. *Theriogenology*, v.80, n.5, p.443-450, 2013.

Vojtech L, Woo S, Hughes S, Levy C, Ballweber L, Sauteraud RP, Strobl J, Westerberg K, Gottardo R, Tewari M, Hladik F. Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Research*, v.42, n.11, p.7290-7304, 2014.

Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, v. 60/61, p: 481-492, 2000.

Wang J, Chen J, Sem S. MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *J Cellular Physiol*, v.231, p.25-30, 2015.

Weitze, KF, Rath D, Baron D. New aspects of preservation of boar sperm by deep freezing in plastic tubes, *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, v.94, n.8, p.485-488, 1987.

Wiggin HB, Almquist JO. Combinations of glycerol percent, glycerol equilibration time, and thawing rate upon freezability of bull spermatozoa in plastic straws. *J Dairy Sci*, v.58, n.3, p.416-419, 1975.

Yadav RP, Kotaja N. Small RNAs in spermatogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, v.382, p.498-508, 2014.

Yeste M, Estrada E, Casas I, Bonet S, Rodríguez-Gil JE. Good and bad freezability boar ejaculates differ in the integrity of nucleoprotein structure after freeze--thawing but not in ROS levels. *Theriogenology*, v.79, p.929-939, 2013a.

Yeste M, Flores E, Estrada E, Bonet S, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. Reduced glutathione and procaine hydrochloride protect the nucleoprotein structure of boar spermatozoa during freeze-thawing by stabilising disulfide bonds. *Reprod Fertil Dev*, v.25, p.1036-1050, 2013b.

Yeste M, Estrada E, Pinart E, Bonet S, Miró J, Rodríguez-Gil JE. The improving effect of reduced glutathione on boar sperm cryotolerance is related with the intrinsic ejaculate freezability. *Cryobiology*, v.68, n.2, p.251-261, 2014a.

Yeste M, Estrada E, Rivera Del Álamo MM, Bonet S, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. The increase in phosphorylation levels of serine residues of protein HSP70 during holding time at 17°C is concomitant with a higher cryotolerance of boar spermatozoa. *PLOS ONE*, v.9, n. 3, 2014b.

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

Zhang Y, Zeng CJ, He L, Ding L, Tang KY, Peng WP. Selection of endogenous reference microRNA genes for quantitative reverse transcription polymerase chain reaction studies of boar spermatozoa cryopreservation. *Theriogenology*, v.83, p.634-641, 2015.

Zhang Y, Dai D, Chang Y, Li Y, Zhang M, Zhou G, Peng Z, Zeng C. Cryopreservation of boar sperm induces differential microRNAs expression. *Cryobiology*, p.1-10, 2017.
