

Importância do plasma seminal na qualidade e preservação do espermatozoide suíno

Importance of seminal plasma in the quality and preservation of boar sperm

André Furugen Cesar de Andrade^{1*}, Rosa Daniela Palchucán Nieto¹, Henricco Zapparoli e Silva¹,
Guilherme Ferreira da Silva¹, Ana Carolina Pedrosa¹, Simone Maria Massami Kitamura Martins²

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – FMVZ/USP; ²Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo – FZEA-USP

Resumo

Ao preservar o espermatozoide suíno no estado líquido ou criopreservado, os componentes do plasma seminal (PS) contidos nos ejaculados podem alterar a capacidade de fertilização desses gametas. O PS contém substâncias essenciais para a manutenção da viabilidade e fertilidade dos espermatozoides. No entanto, esses componentes podem ser deletérios dependendo da quantidade ou duração do tempo de contato entre a ejaculação e a remoção do PS durante o processamento do sêmen para a conservação na forma refrigerada ou congelada. Foram identificadas substâncias que prejudicam (principal proteína plasmática seminal PSPI) ou melhoram (espermadhesina PSP-I) a capacidade de fertilização dos espermatozoides. Dependendo dos cachacos e dos procedimentos de colheita de sêmen, a remoção do PS pode ser benéfica antes da preservação no estado líquido ou criopreservado. Em alguns casos, o PS removido antes da congelação pode ser adicionado de volta ao diluente de descongelamento, com efeitos positivos no sêmen descongelado e na viabilidade do espermatozoide no trato reprodutivo da porca. Neste texto, há um foco nos diferentes efeitos de PS em amostras de sêmen refrigerado e criopreservado de suínos com ênfase em como PS modula a função e morfologia das células espermáticas antes, durante e após a preservação de forma refrigerada ou criopreservada.

Palavras-Chaves: sêmen; criopreservação; criotolerância; biomarcadores; fertilidade

Abstract

When preserving sperm in the liquid or cryopreserved state, seminal plasma (SP) components within ejaculates can alter fertilizing capacity of these gametes. The SP contains substances essential for maintenance of sperm viability and fertility; however, these components can be deleterious depending on quantity, or duration of time before there is removal of SP from sperm in semen processing. Substances that impair (Major seminal plasma protein PSPI - boar) or improve (e.g., spermadhesin PSP-I - boar) spermatozoa fertilizing capacity have been identified. Depending on individual males and semen collection procedures, SP removal may be beneficial before preservation in the liquid or cryopreserved state. In some cases, SP that is removed can be added back to thawing extender with there being positive effects in thawed sperm and for sperm viability in the female reproductive tract. In this review article, there is a focus on different effects of SP in samples of cooled and cryopreserved semen from boar with there being emphasis on how SP modulates the function and morphology of sperm cells before, during, and after preservation in the refrigerated or cryopreserved state.

Keywords: semen; cryopreservation; cryotolerance; biomarkers; fertility

Introdução

O plasma seminal (PS) é o produto secretório de diferentes estruturas do trato reprodutivo masculino como: *rete testis*, epidídimos e das glândulas sexuais acessórias, desta forma, apresentando uma composição química variada (Garner e Hafez, 2016). Desse conteúdo 3-5% tem origem nos testículos e epidídimos, já as glândulas vesiculares contribuem com cerca de 25-30%, a próstata com 35-40% e as glândulas bulbouretrais com 10-25% do volume final do ejaculado que pode atingir cerca de 150-300 mL. O ejaculado leva em torno de 10 a 30 minutos para ser coletado (Rodríguez-Martinez et al., 2022).

O sêmen após a ejaculação é composto por duas porções, uma celular representada pelos espermatozoides, os quais por sua vez, correspondem a 1% do volume total e outra acelular, a qual recebe a denominação de PS. O PS desempenha importante papel, não somente sobre a fisiologia espermática,

*Correspondência: andrefc@usp.br

Recebido: 15 de maio de 2023

Aceito: 22 de maio de 2023

mas também no processo de fecundação. Vários componentes orgânicos e inorgânicos compõem o PS como aminoácidos, proteínas, íons, bicarbonato, produtos antimicrobianos, lipídios e uma gama variada de substâncias hormonais.

Durante a coleta de sêmen, os espermatozoides são submetidos a uma situação muito diversa do que ocorre naturalmente durante a cobertura. As células espermáticas *in vitro* são expostas a todas as secreções das glândulas anexas de uma só vez. *In vivo* as células espermáticas do cachaço não são necessariamente expostas a todas as secreções que constituem o PS, já que essas são liberadas em pulsos ejaculatórios e assim os espermatozoides são banhados por diferentes concentrações de constituintes do PS, incluindo peptídeos e proteínas (Rodríguez-Martínez et al., 2011; Saravia et al., 2009). Talvez essa seja a explicação de que apesar de todos os benefícios que o PS desempenha *in vivo*, estudos mostram que nem sempre esse é o melhor meio para a conservação dos espermatozoides suínos (Leal et al., 2018; Torres et al., 2016).

Diante do apresentado, a presente revisão enfoca nos diferentes efeitos do PS em amostras de sêmen refrigerado e criopreservado de suínos, abordando como o PS modula a célula espermática antes, durante e após a preservação de forma refrigerada ou congelada.

A importância do plasma seminal no sêmen suíno

Em estudo realizado por Saravia et al. (2009) foi levantada a possibilidade do PS influenciar motilidade do espermatozoide suíno, bem como a sua resistência ao choque frio e ao estresse oxidativo. Um grande número de enzimas foram encontradas no plasma seminal e a maioria delas possuíam ação antioxidante, protegendo os lipídios da membrana plasmática contra a peroxidação gerada pelas espécies reativas de oxigênio, evitando assim a fragmentação do DNA espermático (Lewis et al., 1997). Várias substâncias desempenham função antioxidante, protegendo a célula espermática contra os efeitos nocivos das espécies reativas de oxigênio. Dentre estas podemos citar as enzimas antioxidantes catalase, superóxido-dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPX) e glutatona redutase (GRD) (Pavaneli et al., 2021).

Apesar do não conhecimento da natureza de todos os seus componentes, sabe-se que alguns desses são importantes no desenvolvimento e maturação espermática ainda no ambiente testicular. Também há evidências de que o PS desempenha papel ativo no trato reprodutivo da fêmea através da ação de vários hormônios e enzimas, proteínas, lipídios, metabólitos e vesículas extracelulares que o compõe (Alves et al., 2019; Andrade et al., 2022). Ainda com relação à fêmea, o PS melhora o transporte dos espermatozoides na tuba uterina, influencia o momento da ovulação, aumenta o fluxo sanguíneo uterino e modula a resposta imune uterina (Kirkwood et al., 2008; Madej et al., 2012). Essas respostas moduladas pela presença de substâncias como a PGF2 α , estrógenos e ocitocina (Willenburg et al., 2004; Okazaki et al., 2014).

Outros componentes do plasma seminal, apesar de sua aparente simplicidade, desempenham importantes papéis na viabilidade dos espermatozoides, por exemplo, o bicarbonato que modula a motilidade dos espermatozoides e desestabiliza a membrana plasmática durante o processo de capacitação (Rodríguez-Martínez et al., 2001), já o zinco está envolvido na estabilização da cromatina (Björndahl; Kvist, 2010).

Proteínas e peptídeos que perfazem de 30-60 g/L do plasma seminal de suínos, desempenham uma miríade de outras funções (Rodríguez-Martínez et al., 2011). As proteínas do plasma seminal estão envolvidas em várias etapas que precedem a fertilização tais como regulação da capacitação espermática, estabelecimento do reservatório espermático na tuba uterina, modulação da resposta imune uterina, transporte espermático no trato reprodutivo feminino e interação dos gametas (Töpfer-Petersen et al., 2005; Rodríguez-Martínez et al., 2011). No ejaculado suíno, a concentração de proteínas é baixa na fração pré-espermática e é encontrada em alta concentração no início da fração rica. Ainda no início da fração rica, onde também se encontra o maior número de espermatozoides, há a presença de proteínas traduzidas por expressão gênica no epidídimo, como lipocalinas e inibidores da acrosina e tripsina (Rodríguez-Martínez et al., 2009). A real função de todas as proteínas ainda não foi elucidada, entretanto, sabe-se que a fração rica possui não só a maior concentração de proteínas, mas também há maior população de espermatozoides com maior capacidade de resistir ao processo de congelamento (Alkmin et al., 2014; Torres et al., 2016), mas não ao de refrigeração (Sebastian-Abad et al., 2021).

Estudos mais recentes têm demonstrado que a função do PS depende do ejaculado, mas está relacionada ao indivíduo, havendo a presença de micro-RNAs, metabólitos e proteínas relacionadas a ejaculados que suportem mais ou menos o processo de refrigeração e congelamento (Menezes et al., 2020; Pedrosa et al., 2021; Torres et al., 2022).

O efeito do plasma seminal na preservação do sêmen refrigerado

A maioria dos espermatozoides de suínos são armazenados a 17°C por até 72 horas, uma prática comumente usada em mais de 95% de todos os procedimentos de IA realizados em suínos (Knox, 2016; Yeste et al., 2017). O armazenamento do espermatozoide com PS resulta em preservação mais eficaz da motilidade espermática e da integridade da membrana quando comparado ao sêmen preservado com a presença do PS (Leal et al., 2018). Contudo, em outros trabalhos realizados por nossa equipe este efeito não foi observado (Pavaneli et al., 2020). Na verdade, no trabalho de Pavaneli et al. (2019), as porcentagens de capacitação dos espermatozoides armazenados com ou sem PS foram semelhantes, enquanto os espermatozoides armazenados em condições em que o PS foi removido tiveram menos danos no acrossomo e quando esse sêmen foi usado para IA, houve maiores porcentagens de gestação e maiores porcentagens de embriões implantados.

A fim de compreender o efeito do PS no armazenamento prolongado do sêmen de cachacos, testou-se a presença do PS nas concentrações de 15% e 30% por até 72 h à 17°C. Nesse experimento foi observado que houve indução de capacitação *in vitro* e exocitose do acrossoma quando o PS não foi removido do sêmen antes do armazenamento (Pavaneli et al., 2020). Esses achados indicaram que as vias envolvendo Ca^{2+} e a fosforilação de tirosina do glicogênio sintase quinase-3 α e β foram afetadas pela presença do PS durante os períodos de armazenamento do sêmen suíno. Vale ressaltar que nesta série de estudos houve avaliação dos efeitos do PS oriundo da fração rica em espermatozoides (SRF). Luther e Waberski (2019) avaliaram a adição de 0,5% ou 10% de PS oriundo de determinadas frações do ejaculado, e de todo o ejaculado, antes de armazenar o sêmen em duas concentrações diferentes de espermatozoides (10×10^6 ou 18×10^6 espermatozoides/mL) pelo tempo de 144 horas. Houve efeitos nocivos do PS na motilidade espermática quando se adicionou 0,5% de PS a amostras com 10×10^6 espermatozoides/mL, indicando que PS prejudica a sobrevivência *in vitro* de espermatozoides suínos, dependendo da concentração de PS, concentração de espermatozoides e duração do tempo que o sêmen é armazenado com a presença do PS.

Em estudos onde houve avaliação dos efeitos do PS usando procedimentos de proteômica, foi determinado que quando a proteína *Major Seminal Plasma* PSP-I estava em maiores concentrações nos ejaculados, os espermatozoides eram menos resistentes ao resfriamento a 17°C, conforme indicado pelos valores de viabilidade espermática. No mesmo estudo, a espermadesina PSP-I, a cathepsina B, o precursor da proteína secretora do epidídimo E1 e a proteína de ligação IgGFc foram mais abundantes no sêmen dos cachacos nos quais a viabilidade espermática foi mantida por um tempo relativamente maior quando houve a mesma condição de armazenamento (De Lazari et al., 2020). Em outro estudo realizado foi observado três outras proteínas candidatas a marcadores de resistência a refrigeração, a precursora de granulina, a leguminária e AWN (Höfner et al., 2020). Essas proteínas foram menos abundantes nas amostras onde houve maior qualidade espermática após armazenamento prolongado.

O efeito do plasma seminal no sêmen criopreservado

O processo de criopreservação é aplicado em diversas espécies domésticas, porém nos suínos, o uso de sêmen criopreservado ainda é restrito (Eriksson et al., 2001). As técnicas de realização da criopreservação para o sêmen suíno demonstradas são variadas, podendo ser realizada por uso de vapor de nitrogênio líquido (Zhu et al., 2019); com a utilização de congeladores com controle da taxa de resfriamento (Schäfer et al., 2017); e vitrificação (Arraztoa et al., 2017). Contudo, a técnica de eleição é a congelação em duas etapas com uma refrigeração até 5°C, temperatura na qual é adicionado o diluidor com os crioprotetores penetrantes, seguido de uma congelação rápida até atingir -196°C (Andrade et al., 2019; Monteiro et al. 2022).

O *holding time* é um período de refrigeração lenta prévio à criopreservação, no qual o sêmen fica ligeiramente diluído em meio de refrigeração e em contato com seu próprio PS. Esse processo aumenta a resistência do espermatozoide suíno à congelação (Gale et al., 2015; Tomás et al., 2014; Eriksson et al., 2001; Yeste et al., 2014; Casas; Althouse, 2013; Torres et al., 2019), sendo uma etapa recomendada no processo de criopreservação. Sabe-se ainda que é necessário que o *holding time* ocorra por um período mínimo de 3 horas (Yeste et al., 2014) e preferencialmente por 24 horas (Torres et al., 2019). Até o momento, acredita-se que esse aumento de resistência à criopreservação deve-se a um aumento nos níveis de fosforilação dos resíduos de serina da proteína HSP70 (heat-shock protein 70kDa) (Yeste et al., 2014). Ainda, foi descrito uma diferença na abundância das proteínas HSP90a (proteína do choque térmico alfa de 90 kDa), L-PGDS (prostaglandina D sintase do tipo lipocalina) e NPC2 (proteína da doença de Niemann-Pick tipo C2), demonstrando que a HSP90a está aumentada no plasma seminal após 3 horas de *holding time*, estando mais pronunciado em machos de baixa congelabilidade (Valencia et al., 2017). Já a NPC2

encontra-se aumentada no PS de cachaços de alta congelabilidade, independentemente do tempo de *holding time* utilizado (Valencia et al., 2017). Com relação a L-PGDS, esta possui menor abundância em espermatozoides de cachaços com baixa congelabilidade após 3 horas de manutenção à 17°C (Valencia et al., 2017).

Em estudos mais recentes, verificou-se que as moléculas inosina, hipoxantina, creatina, ADP, niacinamida, espermina e 2-metilbutirilcarnitina, que estão presentes no espermatozoide, mas não no plasma seminal, estão envolvidas em um aumento da capacidade de congelamento durante o *holding time* (Torres et al., 2022).

Para a congelação de sêmen de cachaços, a centrifugação para aumentar a concentração de espermatozoides previamente à diluição com diluidor de congelação é uma etapa obrigatória. Desse modo, a retirada do PS é realizada previamente à congelação. Sabe-se que essa retirada melhora o processo de criopreservação. Contudo, sabe-se que a adição de determinadas quantidades de PS no diluidor utilizado para expandir o volume do sêmen descongelado melhora a qualidade e a fertilidade do sêmen suíno criopreservado. Além disso, sabemos que podemos potencializar esta melhora caso o PS seja oriundo de determinados cachaços e de determinadas frações do ejaculado (Torres et al., 2016; Siqueira et al., 2011; Alkmin et al., 2014).

Efeito do plasma seminal na preservação do sêmen de outras espécies de interesse zootécnico

O PS possui efeito diverso na preservação do sêmen a depender da espécie. A espécie equina é a mais sensível ao PS durante os períodos de conservação do sêmen (Höfner et al., 2020), possuindo melhores resultados de preservação quando esta fração é removida antes da refrigeração. A remoção do PS resultou na melhora da motilidade, integridade do DNA e estabilidade da membrana (Jasko et al., 1991, Jasko et al., 1992; Brinsko et al., 2000; Love et al., 2005; Barrier-Battut et al., 2013). No processo de criopreservação, não foram notados benefícios em manter proporções do PS para a realização de inseminações artificiais posteriores (Moore et al., 2005). No entanto, Andrade et al., (2008) demonstraram que realizar a incubação com PS após a descongelação do sêmen equino, propicia a redução na fosforilação da tirosina.

Em touros, o PS é essencial para atenuar os efeitos da diminuição de viabilidade das células espermáticas à medida que se aumenta a diluição da amostra (Garner et al., 2001). Isso deve-se à grande concentração de proteínas *Binder of Sperm* no PS destes animais, o que auxilia na estabilização da membrana plasmática do espermatozoide pela indução da depleção de colesterol e fosfolipídios da membrana, sendo determinante para a viabilidade espermática durante o período de preservação do sêmen (Manjunath et al., 2007; Manjunath, 2012). Em processos de criopreservação, o plasma seminal não é removido, tendo sido constatado uma melhora da qualidade do sêmen criopreservado desse modo (Garner et al., 2001), até mesmo em coletas utilizando eletroejaculadores (Campanholi et al., 2017; Zoca et al., 2021).

Já os carneiros são considerados a espécie menos sensível ao PS (Höfner et al., 2020), possuindo espermatozoides tolerantes a este e que se beneficiam de seus efeitos durante a preservação do sêmen. Foram demonstrados efeitos positivos na taxa de prenhez de ovelhas inseminadas artificialmente com sêmen de carneiro armazenado com 30% de PS comparado àquelas inseminadas com sêmen preservado sem o PS (López-Pérez; Pérez-Clariget, 2012). Ainda, mostrou-se que a adição de 20% ou 40% de PS antes do processo de armazenamento à 15°C resultou em um efeito protetivo para a motilidade espermática, após 24 horas (Mata-Campuzano et al., 2015). Em relação ao processo de criopreservação, experimentos mostraram que a presença ou ausência de PS não possui efeito significativo na viabilidade do sêmen de carneiro (Ramírez-Vasquez et al., 2019).

Perspectivas futuras

Para o futuro, espera-se maiores estudos que possam elucidar as interações dos espermatozoides com plasma seminal, e os mecanismos responsáveis pelos efeitos benéficos ou deletérios em cada espécie doméstica. Já são possíveis realizações de técnicas para definições dos perfis lipídicos, proteicos e de miRNA de diferentes plasmas seminais, no entanto estas são, até o momento, economicamente inviáveis, além de consumirem muito tempo para a realização. Porém, caso seja possível estas análises de maneira mais consistente no futuro, pode-se alcançar resultados extremamente positivos para a conservação do sêmen das diferentes espécies domésticas.

Considerações finais

Em conclusão, as respostas ao uso de PS para preservação do sêmen podem variar dependendo

dos componentes do PS de cada ejaculado. Infelizmente, não é possível analisar as razões dessas diferenças e reconhecer todas as interações entre o sêmen e os componentes do diluidor. No futuro, porém, esse conhecimento possibilitaria auxiliar na tomada de decisões quanto à remoção ou adição de PS ou determinados componentes do PS para melhorar a capacidade de fertilização do sêmen preservado nas espécies domésticas. No momento, existem técnicas que podem ser usadas para definir com mais precisão os perfis de transcrição de lipídios, proteínas e micro-RNAs em amostras específicas de PS. Essas avaliações, no entanto, são demoradas e economicamente caras para avaliar o PS de cada ejaculado. A preservação do sêmen de garanhões e cachacos no estado líquido refrigerado pode ser otimizada quando o PS é removido ou fortemente diluído. Em touros e carneiros, o ideal é não retirar o PS quando o sêmen é armazenado no estado líquido refrigerado, já que há relatos de uma maior fertilidade. É importante lembrar que nessas duas espécies é imprescindível o uso de diluentes com componentes que inibam os efeitos deletérios das BSPs. No processamento de sêmen criopreservado de touros e carneiros, quando o PS não é removido, há uma melhora na viabilidade espermática pós-descongelamento. Com o sêmen suíno, é essencial não remover o PS do sêmen para que os efeitos positivos sobre o espermatozoide ocorram durante o armazenamento a 17 °C por 3 a 24 horas antes da criopreservação. Em garanhões, o PS deve ser removido para a criopreservação. O sêmen congelado pode responder favoravelmente à adição de PS ao meio de descongelamento de sêmen de carneiros, garanhões e cachacos, dependendo da quantidade de PS adicionada. Além disso, acredita-se que a maioria dos fatores PS que tenham efeitos benéficos ou prejudiquem a capacidade de fertilização dos espermatozoides armazenados serão identificados em um futuro próximo. Com esse conhecimento, a adição e remoção/neutralização desses componentes podem levar a melhorias marcantes na qualidade do sêmen dos animais de interesse zootécnico que são preservados no estado refrigerado ou criopreservado, embora, respostas específicas de cada ejaculado sempre devam ser consideradas.

Referências

- Alkmin DV, Perez-Patiño C, Barranco I, Parrilla I, Vazquez JM, Martinez EA, Rodriguez-Martinez 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.
- Alves MBR, Celeghini ECC, Belleannée C.** From Sperm Motility to Sperm-Borne microRNA Signatures: New Approaches to Predict Male Fertility Potential. *Front Cell Dev Biol*, v.8, artigo 791, 2020. doi: 10.3389/fcell.2020.00791. PMID: 32974342; PMCID: PMC7471662.
- Andrade AFC, Knox RV, Torres MA, Pavaneli, APP.** What is the relevance of seminal plasma from a functional and preservation perspective? *Animal Reproduction Science*, v.246, artigo 106946, 2022.
- Andrade AFC, Pedrosa AC, Passarelli MS, Martins SMMK.** Protocolos e possibilidades de criopreservação de sêmen suíno. *Rev Bras Reprod Anim*, v.43, n.2, p.89-96, 2019.
- Andrade AF, Zaffalon FG, Celeghini EC, Nascimento J, Bressan FF, Martins SM, de Arruda RP.** Post-thaw addition of seminal plasma reduces tyrosine phosphorylation on the surface of cryopreserved equine sperm, but does not reduce lipid peroxidation. *Theriogenology*, v.77, n. 9, p.1866-1872.e1-3, 2012. doi:10.1016/j.theriogenology.2012.01.003. Epub 2012 Mar 22. PMID: 22444550.
- Arraztoa CC, Miragaya MH, Chaves MG, Trasorras VL, Gambarotta MC, Pédola CH, Neild DM.** Porcine Sperm Vitrification I: Cryoloops Method. *Andrologia*, v. 49, n. 7, 2017.
- Barrier-Battut I, Bonnet C, Giraud A, Dubois C, Caillaud M, Vidament M.** Removal of Seminal Plasma Enhances Membrane Stability on Fresh and Cooled Stallion Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, v.48, n.1, p.64–71, 2013.
- Björndahl L, Kvist U.** Structure of chromatin in spermatozoa. *Adv Exp Med Biol*, v.791, p.1-11, 2014. doi: 10.1007/978-1-4614-7783-9_1. PMID: 23955669.
- Brinsko SP, Crockett EC, Squires EL.** Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology*, v.54, n.1, p.129–136, 2000.
- Campanholi SP, Monteiro FM, Ribeiro Dias EA, Mercadante MEZ, De Paz CCP, Dell'aqua Junior, JA, Papa FO, Dell'aqua CPF, Vantini R, Garcia JM.** Effect of seminal plasma removal before cryopreservation of bovine semen obtained by electroejaculation on semen quality and *in vitro* fertility. *Theriogenology*, v.89, p.114–121, 2017.
- 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.
- De Lazari FL, Sontag ER, Schneider A, Araripe Moura AA, Vasconcelos FR, Nagano CS, Dalberto PF, Bizarro CV, Mattos RC, Mascarenhas Jobim MI, Bustamante-Filho IC.** Proteomic identification of boar seminal plasma proteins related to sperm resistance to cooling at 17 °C. *Theriogenology*, v.147, p.135-145, 2020. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.11.023. Epub 2019 Nov 19. PMID: 31780059.

- Eriksson BM, Vazquez JM, Martinez EA, Roca J, Lucas X, Rodriguez-Martinez H.** Effects of holding time during cooling and of type of package on plasma membrane integrity, motility and in vitro oocyte penetration ability of frozen-thawed boar spermatozoa. *Theriogenology*, v. 55, n. 8, p. 1593–1605, 2001.
- Gale I, Gil L, Malo C, González N, Martínez F.** Effect of *Camellia sinensis* supplementation and increasing holding time on quality of cryopreserved boar semen. *Andrologia*, v.47, n.5, p.505–512, 2015.
- Garner DL, Hafez ESE.** Spermatozoa and Seminal Plasma, In: E. S. E. Hafez, Ed., *Reproduction in Farm Animals*, Lea & Febiger, Philadelphia, p.165-187, 1993.
- Garner DL, Thomas CA, Gravance CG, Marshall CE, Dejarnette JM, Allen CH.** Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. *Theriogenology*, v.56, n.1, p.31–40, 2001.
- Höfner L, Luther AM, Waberski D.** The role of seminal plasma in the liquid storage of spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v.220, p.106290, 2020.
- Jasko DJ, Hathaway JA, Schaltenbrand VL, Simper WD, Squires EL.** Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.37, n.6, p.1241–1252, 1992.
- Jasko DJ, Moran DM, Farlin ME, Squires EL.** Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. *Theriogenology*, v.35, n.6, p.1059–1067, 1991.
- Kirkwood RN, Vadnais ML, Abad M.** Practical application of seminal plasma. *Theriogenology*, v.70, n.8, p.1364-1367, 2008. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.07.018. Epub 2008 Aug 23. PMID: 18725168.
- Knox RV.** Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology*, v.85, n. 1, p.83-93, 2016. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.07.009. Epub 2015 Jul 16. PMID: 26253434.
- Leal DF, Torres MA, Ravagnani GM, Martins SMMK, Meirelles FV, de Andrade AFC.** Absence of seminal plasma from sperm-rich fraction decreases boar sperm quality characteristics during the course of liquid storage. *Anim Reprod Sci*, v.198, p.20-26, 2018. doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.08.029. Epub 2018 Aug 26. PMID: 30219377.
- Lewis SE, Sterling ES, Young IS, Thompson W.** Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril.*, v.67, n.1, p.142-147, 1997. doi: 10.1016/s0015-0282(97)81871-7. PMID: 8986699.
- López-Pérez A, Pérez-Clariget R.** Ram seminal plasma improves pregnancy rates in ewes cervically inseminated with ram semen stored at 5 °C for 24 hours. *Theriogenology*, v.77, n.2, p.395–399, 2012.
- Love CC, Brinsko SP, Rigby SL, Thompson JA, Blanchard TL, Varner DD.** Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology*, v.63, n.6, p.1584–1591, 2005.
- Luther AM, Waberski D.** In vitro aging of boar spermatozoa: role of sperm proximity and seminal plasma. *Andrology*, v.7, n.3, p.382-390, 2019. doi: 10.1111/andr.12600. Epub 2019 Feb 21. PMID: 30793513.
- Madej M, Norrby M, Madsen M, Johannisson A, Hansen C, Madej A.** The effect of boar seminal plasma on the release of prostaglandins and interleukin-6 by porcine endometrial and cervical cells and bovine endometrial cells. *Reprod Domest Anim*, v.47, n.1, p.113-24, 2012. doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01809.x. Epub 2011 May 26. PMID: 21615801.
- Manjunath P.** New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. *Anim Reprod*, v.9, n.4, p.809–815, 2012.
- Manjunath P, Bergeron A, Lefebvre J, Fan J.** Seminal Plasma Proteins: Functions and Interaction with Protective Agents during Semen Preservation. *Society of Reproduction and Fertility supplement*, v.65, p.217–228, 2007.
- Mata-Campuzano M, Soleilhavoup C, Tsikis G, Martinez-Pastor F, De Graaf SP, Druart X.** Motility of liquid stored ram spermatozoa is altered by dilution rate independent of seminal plasma concentration. *Animal Reproduction Science*, v.162, p.31–36, 2015.
- Menezes TA, Bustamante-Filho IC, Paschoal AFL, Dalberto PF, Bizarro CV, Bernardi ML, Ulguim RDR, Bortolozzo FP, Mellagi APG.** Differential seminal plasma proteome signatures of boars with high and low resistance to hypothermic semen preservation at 5°C. *Andrology*, v.8, n.6, p.1907-1922, 2020. doi: 10.1111/andr.12869. Epub 2020 Aug 5. PMID: 33460278.
- Monteiro MS, Torres MA, Passarelli MS, Martins MP, Ravagnani GM, Papa FO, Alvarenga MA, Dell’Aqua Júnior JA, Yasui GS, Martins SMMK, Andrade AFC.** Impact of cryopreservation protocols (one-and two-step) on boar semen quality at 5 °C and post-thawing. *Anim Reprod Sci*, v.247, 2022.
- Moore AI, Squires EL, Graham JK.** Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.63, n.9, p.2372–2381, 2005.
- Okazaki T, Ikoma E, Tinen T, Akiyoshi T, Mori M, Teshima H.** Addition of oxytocin to semen extender improves both sperm transport to the oviduct and conception rates in pigs following AI. *Anim Sci J*, v.85, n.1, p.8-14, 2014. doi: 10.1111/asj.12089. Epub 2013 Jul 5. PMID: 23829601.

- Pavaneli APP, Martínez CHG, Nakasone DH, Pedrosa AC, Mendonça MV, Martins SMMK, Kawai GKV, Nagai KK, Nichi M, Fontinhas-Netto GV, Fagundes NS, Alkmin DV, de Andrade AFC.** Hydroxy-selenomethionine as an organic source of selenium in the diet improves boar reproductive performance in artificial insemination programs. *J Anim Sci.*, v.99, n.11, skab320, 2021. doi: 10.1093/jas/skab320. PMID: 34741604; PMCID: PMC8763237.
- Pavaneli APP, Recuero S, Chaves BR, Garcia-Bonavila E, Llawanera M, Pinart E, Bonet S, De Andrade AFC, Yeste M.** The Presence of Seminal Plasma during Liquid Storage of Pig Spermatozoa at 17 °C Modulates Their Ability to Elicit In Vitro Capacitation and Trigger Acrosomal Exocytosis. *Int J Mol Sci.*, v.21, n.12, 4520, 2020. doi: 10.3390/ijms21124520. PMID: 32630462; PMCID: PMC7350249.
- Pedrosa AC, Torres MA, Alkmin DV, Pinzon JEP, Martins SMMK, Silveira JC, Andrade AFC.** Spermatozoa and seminal plasma small extracellular vesicles miRNAs as biomarkers of boar semen cryotolerance. *Theriogenology*, v.174, p.60–72, 2021.
- Ramírez-Vasquez RRA, Cano A, Hozbor FA, Cesari A.** Cryopreservation and egg yolk extender components modify the interaction between seminal plasma proteins and the sperm surface. *Theriogenology*, v. 140, p. 153–163, 2019.
- Rodríguez-Martínez H, Kvist U, Ernerudh J, Sanz L, Calvete JJ.** Seminal plasma proteins: what role do they play? *Am J Reprod Immunol.*, v.66, Suppl 1, p.11-22, 2011. doi: 10.1111/j.1600-0897.2011.01033.x. PMID: 21726334.
- Rodríguez-Martínez H, Kvist U, Saravia F, Wallgren M, Johannisson A, Sanz L, Peña FJ, Martínez EA, Roca J, Vázquez JM, Calvete JJ.** The physiological roles of the boar ejaculate. *Soc Reprod Fertil Suppl.*, v.66, p.1-21, 2009. PMID: 19848263.
- Rodríguez-Martínez H, Roca J.** Extracellular vesicles in seminal plasma: A safe and relevant tool to improve fertility in livestock? *Anim Reprod Sci.*, v.244, 107051, 2022. doi: 10.1016/j.anireprosci.2022.107051. Epub 2022 Aug 3. PMID: 35933831.
- Rodríguez-Martínez H, Tienthai P, Suzuki K, Funahashi H, Ekwall H, Johannisson A.** Involvement of oviduct in sperm capacitation and oocyte development in pigs. *Reprod Suppl.*, v.58, p.129-45, 2001. PMID: 11980185.
- 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. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.09.037. Epub 2008 Oct 26. PMID: 18952274.
- Schäfer J, Waberski D, Jung M, Schulze M.** Impact of Holding and Equilibration Time on Post-Thaw Quality of Shipped Boar Semen. *Animal Reproduction Science*, v.187, p.109–115, 2017.
- Sebastián-Abad B, Llamas-López PJ, García-Vázquez FA.** Relevance of the Ejaculate Fraction and Dilution Method on Boar Sperm Quality during Processing and Conservation of Seminal Doses. *Vet Sci.*, v.8, n.12, p.292, 2021. doi: 10.3390/vetsci8120292. PMID: 34941819; PMCID: PMC8704743.
- Siqueira AP, Wallgren M, Hossain MS, Johannisson A, Sanz L, Calvete JJ, Rodríguez-Martínez H.** Quality of boar spermatozoa from the sperm-peak portion of the ejaculate after simplified freezing in Mini Flatpacks compared to the remaining spermatozoa of the sperm-rich fraction. *Theriogenology*, 2011.
- Tomás C, Gómez-Fernández J, Gómez-Izquierdo E, 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. *Animal Reproduction Science*, v.144, n.3, p.115–121, 2014.
- Töpfer-Petersen E, Ekhlesi-Hundrieser M, Kirchoff C, Leeb T, Sieme H.** The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *Anim Reprod Sci.*, v.89, n.1-4, p.159-170, 2005. doi: 10.1016/j.anireprosci.2005.06.018. PMID: 16125345.
- Torres MA, Ravagnani GM, Leal DF, Martins SMMK, Muro BBD, Meirelles FV, Papa FO, Dell'Aqua Junior JA, Alvarenga MA, Moretti AS, Andrade AFC.** Seminal plasma arising from the whole boar sperm-rich fraction increases the stability of sperm membrane after thawing. *J. Anim. Sci.*, v. 94, 2016.
- Torres MA, Monteiro MS, Passarelli MS, Papa FO, Dell'aqua JA, Alvarenga MA, Martins SMMK, Andrade AFC.** The ideal holding time for boar semen is 24 h at 17 °C prior to short-cryopreservation protocols. *Cryobiology*, v.86, p.58–64, 2019.
- Torres MA, Pedrosa AC, Novais FJ, Alkmin DV, Cooper BR, Yasui GS, Fukumasu H, Machaty Z, Andrade AFC.** Metabolomic signature of spermatozoa established during holding time is responsible for differences in boar sperm freezability. *Biol Reprod*, v.106, p.213–226, 2022.
- Valencia J, Gómez G, López W, Mesa H, Henao FJ.** Relationship between HSP90a, NPC2 and L-PGDS proteins to boar semen freezability. *J Anim Sci Biotechnol*, v.8, p.21, 2017. doi: 10.1186/s40104-017-0151-y. PMID: 28270911; PMCID: PMC5335742.
- Willenburg KL, Knox RV, Kirkwood RN.** Effect of estrogen formulation and its site of deposition on

serum PGFM concentrations, uterine contractility, and time of ovulation in artificially inseminated weaned sows. *Anim Reprod Sci.*, v.80, n.1-2, p.147-156, 2004. doi: 10.1016/S0378-4320(03)00155-6. PMID: 15036523.

Yeste M, Estrada E, Rivera Del Alamo M-M, Bonet S, Rigau T, Rodriguez-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, p. e90887, 2014.

Yeste M, Rodríguez-Gil JE, Bonet S. Artificial insemination with frozen-thawed boar sperm. *Mol Reprod Dev.*, v.84, n. 9, p. 802-813, 2017. doi: 10.1002/mrd.22840. Epub 2017 Jun 19. PMID: 28608609.

Zhu Z, Zhang P, Li N, Kiang KM, Cheng SY, Wong VK, Leung GK. Lovastatin enhances cytotoxicity of temozolomide via impairing autophagic flux in glioblastoma cells. *BioMed Research International*, v.23, p.2019, 2019.

Zoca GB, Celeghini ECC, Pugliesi G, Carvalho CPT, Assumpção MEOD, Siqueira AFP, Oliveira LZ, Lançoni R, Arruda RP. Influence of Seminal Plasma during Different Stages of Bovine Sperm Cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, v.56, n.6, p.872–883, 2021.