

Efeito do diluente de criopreservação na qualidade dos espermatozoides de cachaços

Henricco Zapparoli¹, Luan Mendes de Oliveira Bezerra¹, Isadora Ribeiro de Martino¹, Guilherme Ferreira da Silva¹, Larissa Ferreira de Oliveira¹, Felipe Pezo², Raul Sanchez³, Simone Maria Massami Kitamura Martins¹, André Furugen Cesar de Andrade^{1*}

¹Núcleo de Pesquisa em Suínos (NPS) – Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, São Paulo, Brasil; ²Facultad de Ciencias Agropecuarias y Medioambiente - Universidad de La Frontera, Temuco, Chile; ³Faculty of Medicine, Departamento de Ciências Pré-clínicas - University of La Frontera, Temuco, Chile

*E-mail: andrefc@usp.br

A inseminação artificial (IA) é amplamente utilizada na suinocultura, com 98% das granjas empregando sêmen refrigerado a 17°C. Embora a criopreservação seminal represente uma alternativa promissora para otimizar a eficiência reprodutiva, sua aplicação ainda enfrenta desafios, especialmente devido aos danos celulares resultantes do congelamento e descongelamento. Este estudo avaliou o impacto de dois diluentes de criopreservação, CryoPig e CryoPig+, na qualidade espermática pós-descongelamento. Foram utilizados três ejaculados de três cachaços (n = 9) (DanBred® linhagem DBL17600), cujas frações ricas foram coletadas pelo método da mão enluvada e divididas em dois grupos experimentais: CryoPig, submetido ao processo de criopreservação com o diluente CryoPig; e CryoPig+, submetido ao mesmo processo utilizando o diluente CryoPig+. Antes da criopreservação, foi realizado o Holding Time a 17°C, seguido de centrifugação (800 x g/10 min). O pellet espermático foi diluído na fração A dos respectivos diluentes para uma concentração de 1,5 x 10⁹ espermatozoides/mL e posteriormente resfriado a 5°C por 180 minutos. Em seguida, a fração B foi adicionada até a concentração final de 1 x 10⁹ espermatozoides/mL, e o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL. Todo o processamento foi realizado a 5°C em uma cabine refrigerada (Minitüb GmbH, Tiefenbach), e a congelamento ocorreu de forma automatizada no equipamento Cryogen™ (Neovet). A curva de congelamento seguiu os seguintes parâmetros: resfriamento de 5°C a -5°C (-6°C/min), de -5°C a -80°C (-39,82°C/min), manutenção a -80°C por 30 segundos e resfriamento a -150°C (-60°C/min), seguido de imersão em nitrogênio líquido (-196°C). As palhetas foram armazenadas em botijões criogênicos até o momento das análises. Para a descongelamento, duas palhetas por ejaculado foram submersas em banho-maria (50°C/20 s). A avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal foi realizada por citometria de fluxo (BD FACSAria, software BD FACSDiva 6.0), utilizando as sondas Hoechst 3342 (2 µL de concentração 40 µg/mL), Iodeto de Propídio (3 µL de concentração IP-0,5 mg/mL), FITC-PSA (10 µL de concentração 100 µg/mL), YO-PRO (50 nM) e DHE (2 µM) (Molecular Probes Inc. e Sigma-Aldrich Co.). A motilidade total e progressiva foi analisada pelo sistema SCA® (SCA Production software v.5.4.0.0). Os dados foram submetidos a teste de normalidade de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE) e homogeneidade de variâncias (teste de Levene). A análise estatística foi realizada pelo procedimento MIXED (SAS v.9.4), considerando um delineamento em blocos casualizados com tratamentos (CryoPig e CryoPig+) como efeito fixo, e os animais e as coletas como efeito aleatório. Os tratamentos foram comparados utilizando o procedimento PDIF, e o nível de significância considerado foi P < 0,05. Os resultados demonstraram diferenças significativas (P < 0,05) entre os tratamentos para motilidade total (%): CryoPig (33.82 ± 5.17) vs. CryoPig+ (61.48 ± 5.12); motilidade progressiva (%): CryoPig (17.89 ± 3.75) vs. CryoPig+ (39.99 ± 4.19); e integridade de membrana plasmática e acrossomal (%): CryoPig (18.88 ± 4.56) vs. CryoPig+ (35.71 ± 4.35). Os dados indicam melhor desempenho do CryoPig+ em comparação ao CryoPig, evidenciando sua eficácia na preservação da funcionalidade espermática pós-descongelamento. Conclui-se que o diluente CryoPig+ melhorou significativamente a motilidade espermática e a integridade das membranas plasmática e acrossomal, tornando-se uma alternativa promissora para aprimorar o processo de criopreservação seminal em suínos. Em razão desses resultados, as fórmulas dos diluentes utilizados encontram-se restritas pois seguirá para o processo de patente.

Palavras-chave: Suínos, criopreservação de sêmen, citometria, motilidade.

Agradecimentos: À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-2022/09573-2, processo FAPESP-UFRO FPP22-0022), à CAPES (Código de Financiamento 001) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 310486/2023-8).

Effect of Cryopreservation Extender on the Sperm Quality of Boars

Henricco Zapparoli¹, Luan Mendes de Oliveira Bezerra¹, Isadora Ribeiro de Martino¹, Guilherme Ferreira da Silva¹, Larissa Ferreira de Oliveira¹, Felipe Pezo², Raul Sanchez³, Simone Maria Massami Kitamura Martins¹, André Furugen Cesar de Andrade^{1*}

¹Research Swine Center (NPS) – University of São Paulo (USP), Pirassununga, São Paulo, Brazil; ²Facultad de Ciencias Agropecuarias y Medioambiente - Universidad de La Frontera, Temuco, Chile; ³Faculty of Medicine, Departamento de Ciências Pré-clínicas - University of La Frontera, Temuco, Chile

*E-mail: andrefc@usp.br

Artificial insemination (AI) is widely used in pig farming, with 98% of farms using semen cooled to 17°C. Although semen cryopreservation is a promising alternative to enhance reproductive efficiency, its application still faces challenges, especially due to cell damage from the freezing and thawing process. This study evaluated the impact of two cryopreservation extenders, CryoPig and CryoPig+, on post-thaw sperm quality. Three ejaculates from three boars (n = 9) (DanBred® line DBLI7600) were used. The rich fractions were collected using the gloved-hand method and divided into two experimental groups: CryoPig, subjected to cryopreservation with the CryoPig extender; and CryoPig+, subjected to the same process using the CryoPig+ extender. Prior to cryopreservation, semen underwent Holding Time at 17°C, followed by centrifugation (800 x g / 10 min). The sperm pellet was diluted in fraction A of the respective extenders to a concentration of 1.5 x 10⁹ sperm/mL and cooled to 5°C for 180 minutes. Then, fraction B was added until a final concentration of 1 x 10⁹ sperm/mL, and the semen was packed into 0.5 mL straws. All processing was carried out at 5°C in a refrigerated chamber (Minitüb GmbH, Tiefenbach), and freezing was done automatically using the Cryogen™ equipment (Neovet). The freezing curve followed these parameters: cooling from 5°C to -5°C (-6°C/min), from -5°C to -80°C (-39.82°C/min), held at -80°C for 30 seconds, then cooled to -150°C (-60°C/min), followed by immersion in liquid nitrogen (-196°C). Straws were stored in cryogenic tanks until analysis. For thawing, two straws per ejaculate were submerged in a water bath (50°C / 20 s). Plasma membrane and acrosomal integrity were assessed by flow cytometry (BD FACSAria, BD FACSDiva 6.0 software), using the following probes: Hoechst 3342 (2 µL at 40 µg/mL), Propidium Iodide (3 µL at 0.5 mg/mL), FITC-PSA (10 µL at 100 µg/mL), YO-PRO (50 nM), and DHE (2 µM) (Molecular Probes Inc. and Sigma-Aldrich Co.). Total and progressive motility were analyzed using the SCA® system (SCA Production software v.5.4.0.0). Data were subjected to the Shapiro-Wilk normality test (PROC UNIVARIATE) and Levene's test for homogeneity of variances. Statistical analysis was performed using the MIXED procedure (SAS v.9.4), with a randomized block design considering treatments (CryoPig and CryoPig+) as fixed effects and animals and collections as random effects. Treatments were compared using the PDIF procedure, with a significance level of P < 0.05. The results showed significant differences (P < 0.05) between treatments for: Total motility (%): CryoPig (33.82 ± 5.17) vs. CryoPig+ (61.48 ± 5.12); Progressive motility (%): CryoPig (17.89 ± 3.75) vs. CryoPig+ (39.99 ± 4.19); Plasma membrane and acrosomal integrity (%): CryoPig (18.88 ± 4.56) vs. CryoPig+ (35.71 ± 4.35). The data indicate superior performance of CryoPig+ compared to CryoPig, showing its effectiveness in preserving sperm functionality after thawing. It is concluded that the CryoPig+ extender significantly improved sperm motility and membrane integrity, making it a promising alternative to enhance the semen cryopreservation process in swine. Due to these results, the extender formulas are restricted and will proceed to the patent application phase.

Keywords: Swine, semen cryopreservation, flow cytometry, motility.

Acknowledgments: To the São Paulo Research Foundation (FAPESP – 2022/09573-2, FAPESP-UFRO process FPP22-0022), CAPES (Funding Code 001), and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq – 310486/2023-8).

Adição de IGF-I durante o Holding time do processo de criopreservação do sêmen suíno.

Isadora Ribeiro De Martino¹, Luan Mendes de Oliveira Bezerra¹, Guilherme Ferreira da Silva¹, Henricco Zapparoli¹, Simone Maria Massami Kitamura Martins¹, André Furugen Cesar de Andrade^{1*}

¹Núcleo de Pesquisa em Suínos – Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, São Paulo, Brasil;

*E-mail: andrefc@usp.br

Durante a criopreservação, o espermatozoide passa por diversos processos que podem ocasionar uma perda de motilidade e integridade de membrana, chamados de crioinjúrias. Com isso, o Holding Time (HT) é utilizado para aumentar a criotolerância dos espermatozoides como uma alternativa para melhorar os parâmetros de qualidade espermática pós-descongelamento, visto que durante este período há interação entre os componentes do plasma seminal e a membrana plasmática dos espermatozoides. Ainda, com o intuito de otimizar o processo de criopreservação diversos estudos relataram a adição de substâncias ao sêmen que otimizem o processo. O IGF-I é um peptídeo, que atua na regulação do crescimento, sendo um hormônio promotor de crescimento, o qual já demonstrou efeitos positivos quando adicionado ao sêmen criopreservado de algumas espécies, proporcionando maior integridade de membrana e aumento da motilidade progressiva, no entanto este ainda não havia sido estudado em sêmen criopreservado de suínos. Diante do exposto, foi proposto a adição do IGF-I ao diluidor do sêmen de cachorros, logo após a coleta do ejaculado, durante o HT, com o objetivo de preservar a viabilidade espermática durante o processo de congelamento, e obter melhores resultados de motilidade e integridade de membrana. Foram utilizados dois ejaculados de três cachorros (n=6) (DanBred[®] linhagem DBLI7600), os quais as frações ricas foram divididas em quatro frações de mesmo volume, sendo acrescentados os tratamentos: Controle: somente diluidor Vitasem[®]; IGF50: diluidor Vitasem[®] + IGF-I (50ng/ml); IGF100: Vitasem[®] + IGF-I (100 ng/ml); IGF150: Vitasem[®] + IGF-I. Estes foram submetidos ao processo de criopreservação, e após o descongelamento à 50°C por 20 segundos, o sêmen foi avaliado pelo sistema computadorizado SCA[®] com SCA Production software v.5.4.0.0, quanto à motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade do trajeto (VAP, µm/s), velocidade progressiva (VSL, µm/s), velocidade curvilínea (VCL, µm/s), deslocamento lateral de cabeça (ALH, µm) e frequência de batimento flagelar (BCF, Hz). Quanto à integridade de membrana plasmática e acrossomal, foi feita a análise por citometria de fluxo (BD FACSAria, BD FACSDiva 6.0) com auxílio das sondas fluorescentes Hoechst 3342, Iodeto de Propídio e FITC-PSA (Molecular Probes Inc. e Sigma-Aldrich Co.), sendo avaliado acrossoma e membrana plástica íntegros (AIMI, %) e acrossoma lesado e membrana plasmática íntegra (ALMI, %). Os dados obtidos dos procedimentos experimentais foram analisados com prévia verificação da normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE) e homogeneidade de variâncias (teste de Levene). Os dados foram analisados utilizando o procedimento MIXED do software SAS (v. 9.4), considerando um delineamento em blocos casualizados com os tratamentos como efeito fixo e os animais e as coletas como efeito aleatório. Os tratamentos foram analisados por regressão, e o nível de significância considerado foi $P < 0,05$. Não houve efeito de tratamento entre as variáveis, no entanto, numericamente a adição de 150ng/ml de IGF-I melhorou a motilidade total (48.48±9.49%) em relação ao controle, IGF50 e IGF100 (28.58±3.58%; 46.50±8.56% e 42.90±4.87%). Também houve melhora na motilidade progressiva com a adição de 150ng/ml de IGF (30.09±7.64%) entre o controle e os demais tratamentos, de IGF50 e IGF100 (14.76±2.66%; 29.53±6.97% e 25.41±3.19%). Para as variáveis VAP e VSL, houve um aumento na velocidade nos animais tratados com IGF50 (45.63±4.10 µm/s e 26.26±3.82 µm/s, respectivamente), IGF100 (46.33±2.79 µm/s e 25.42±1.79 µm/s, respectivamente) e IGF150 (45.20±5.52 µm/s e 24.87±3.55 µm/s, respectivamente) em relação ao controle (39.12±3.65 µm/s e 20.13±2.68 µm/s, respectivamente). Em relação a integridade de membrana também houve melhora no AIMI nos animais tratados com IGF50 e IGF150 (24.07±3.14% e 25.03±5.93%, respectivamente) sobre os animais tratados com IGF100 e o grupo controle (15.90±5.21% e 17.50±4.50%, respectivamente). Pode-se concluir com este estudo que o uso do IGF-I, assim como nas demais espécies, pode influenciar nos parâmetros de qualidade espermática, sendo sugestivo mais estudos para uma conclusão estatística, de forma a representar uma opção promissora no processo de criopreservação do sêmen de suínos.

Palavras-chave: Suínos, criopreservação de sêmen, IGF-1.

Agradecimentos: À CAPES (Código de Financiamento 001) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – 310486/2023-8)

Addition of IGF-I During the Holding Time in the Cryopreservation Process of Boar Semen

Isadora Ribeiro De Martino¹, Luan Mendes de Oliveira Bezerra¹, Guilherme Ferreira da Silva¹, Henricco Zapparoli¹, Simone Maria Massami Kitamura Martins¹, André Furugen Cesar de Andrade^{1*}

¹Swine Research Center – University of São Paulo (USP), Pirassununga, São Paulo, Brazil

*E-mail: andrefc@usp.br

During cryopreservation, spermatozoa undergo various processes that may lead to loss of motility and membrane integrity, known as cryoinjuries. Thus, the Holding Time (HT) is used to increase the cryotolerance of spermatozoa as an alternative to improve post-thaw sperm quality parameters, since during this period there is interaction between seminal plasma components and the sperm plasma membrane. Furthermore, aiming to optimize the cryopreservation process, several studies have reported the addition of substances to semen that enhance the process. IGF-I is a peptide that plays a role in growth regulation, being a growth-promoting hormone, which has already shown positive effects when added to cryopreserved semen of some species, providing greater membrane integrity and increased progressive motility. However, it had not yet been studied in cryopreserved boar semen. Therefore, this study proposed the addition of IGF-I to the semen extender of boars immediately after ejaculate collection, during HT, aiming to preserve sperm viability during the freezing process and achieve better motility and membrane integrity results. Two ejaculates from three boars (n=6) (DanBred® linea DBL17600) were used. The rich fractions were divided in four equal-volume fractions, receiving the following treatments: Control: only Vitasem® extender; IGF50: Vitasem® extender + IGF-I (50 ng/ml); IGF100: Vitasem® + IGF-I (100 ng/ml); IGF150: Vitasem® + IGF-I (150 ng/ml). The samples were cryopreserved and, after thawing at 50°C for 20 seconds, semen was evaluated using the SCA® computerized system with SCA Production software v.5.4.0.0 for total motility (TM, %), progressive motility (PM, %), velocity average path (VAP, µm/s), velocity straight-line (VSL, µm/s), curvilinear velocity (VCL, µm/s), amplitude of lateral head displacement (ALH, µm), and beat cross frequency (BCF, Hz). Plasma and acrosomal membrane integrity were assessed by flow cytometry (BD FACSAria, BD FACSDiva 6.0) using the fluorescent probes Hoechst 3342, Propidium Iodide, and FITC-PSA (Molecular Probes Inc. and Sigma-Aldrich Co.), evaluating intact acrosome and plasma membrane (AIMI, %) and damaged acrosome with intact plasma membrane (ALMI, %). Experimental data were analyzed after checking residual normality using the Shapiro-Wilk test (PROC UNIVARIATE) and homogeneity of variances (Levene's test). The data were analyzed using the MIXED procedure of SAS software (v. 9.4), considering a randomized block design with treatments as fixed effects and animals and collections as random effects. Treatments were analyzed by regression, and the significance level considered was $P < 0.05$. No treatment effect was observed for the variables; however, numerically, the addition of 150 ng/ml of IGF-I improved total motility ($48.48 \pm 9.49\%$) compared to the control, IGF50, and IGF100 ($28.58 \pm 3.58\%$; $46.50 \pm 8.56\%$; and $42.90 \pm 4.87\%$). Progressive motility also improved with the addition of 150 ng/ml of IGF ($30.09 \pm 7.64\%$) compared to the control and other treatments IGF50 and IGF100 ($14.76 \pm 2.66\%$; $29.53 \pm 6.97\%$; and $25.41 \pm 3.19\%$). For VAP and VSL variables, an increase in velocity was observed in animals treated with IGF50 (45.63 ± 4.10 µm/s and 26.26 ± 3.82 µm/s, respectively), IGF100 (46.33 ± 2.79 µm/s and 25.42 ± 1.79 µm/s, respectively), and IGF150 (45.20 ± 5.52 µm/s and 24.87 ± 3.55 µm/s, respectively) compared to the control (39.12 ± 3.65 µm/s and 20.13 ± 2.68 µm/s, respectively). Regarding membrane integrity, there was also an improvement in AIMI in animals treated with IGF50 and IGF150 ($24.07 \pm 3.14\%$ and $25.03 \pm 5.93\%$, respectively) compared to those treated with IGF100 and the control group ($15.90 \pm 5.21\%$ and $17.50 \pm 4.50\%$, respectively). This study concludes that the use of IGF-I, as in other species, can influence sperm quality parameters, suggesting further studies for statistical confirmation and representing a promising option in the cryopreservation process of boar semen.

Keywords: Swine, semen cryopreservation, IGF-I.

Acknowledgements: To CAPES (Funding Code 001) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq – 310486/2023-8).

Efeito da adição do preparado aquoso de cianidina 3-glucosídeo e cianidina 3-rutinosídeo sobre a qualidade do sêmen suíno armazenado em diferentes temperaturas por 168 horas: avaliação simultânea da integridade das membranas do espermatozoide

Guilherme Ferreira da Silva¹; Christian Thiago Gomes Santos¹; Leriana Garcia Reis¹; Gabrielle Souza Primo¹; Isadora Ribeiro de Martino¹; Luan Mendes de Oliveira Bezerra¹; Henricco Zapparoli e Silva¹; Lourdes Maria Corrêa Cabral²; Jorgea Pradié³; André Furugen Cesar de Andrade^{1*}

¹Núcleo de Pesquisa em Suínos – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, São Paulo, Brasil, ²Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

³Bretanha Suínos, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil

*E-mail: andrefc@usp.br

O sêmen refrigerado é amplamente utilizado em programas de inseminação artificial em granjas comerciais de suínos, representando mais de 95% das técnicas de inseminação empregadas no país. Para assegurar maior viabilidade e qualidade das doses inseminantes refrigeradas, é fundamental garantir o correto processamento e armazenamento, desde a coleta e diluição do ejaculado, passando pela refrigeração em conservadora a 17 °C, até o momento da inseminação no trato reprodutivo da matriz suína. Estas etapas podem representar diversas ameaças à integridade dos espermatozoides, considerando que a célula espermática suína é altamente suscetível a danos estruturais causados pela peroxidação lipídica, devido à elevada proporção de ácidos graxos insaturados em sua membrana plasmática. Nesse contexto, a adição de moléculas com ação antioxidante ao diluidor é desejável, a fim de atenuar possíveis efeitos deletérios associados ao processo de diluição e refrigeração por períodos prolongados. Sabe-se que a polpa da juçara (*Euterpe edulis Martius*) contém as antocianinas cianidina 3-glucosídeo e cianidina 3-rutinosídeo, que são compostos bioativos com reconhecida atividade antioxidante e propriedades de proteção à membrana plasmática, os quais poderiam oferecer benefícios aos espermatozoides. O objetivo deste experimento foi avaliar os efeitos antioxidantes da adição da polpa da juçara, previamente liofilizada, sobre a integridade das membranas plasmática e acrossomal de espermatozoides suínos, durante a conservação do sêmen diluído em duas diferentes condições de temperatura: ambiente (25 °C) e refrigeração (17 °C), e em dois períodos de armazenamento: 96 horas e 168 horas. Para realização do experimento, foram coletados sete ejaculados de três cachasos de linhagem híbrida comercial, e posteriormente diluídos utilizando o diluidor Optimia® (Magapor, Espanha). Foi feita a divisão do volume total (ejaculado + diluidor) em três partes iguais, e o antioxidante foi adicionado nas seguintes concentrações: 0 µM (controle), 50 µM e 100 µM. Após diluição e homogeneização, as amostras foram envasadas em bisnagas previamente identificadas e mantidas por 90 minutos em temperatura ambiente e, posteriormente, metade foi acondicionada na refrigeradora a 17°C, enquanto a outra metade permaneceu em temperatura ambiente a 25°C. Foram realizadas avaliações para verificar a viabilidade e manutenção de estruturas da célula espermática em três diferentes tempos: imediatamente após os 90 minutos em temperatura ambiente; após 96 horas da diluição; e depois de 168 horas da diluição. Estas avaliações buscaram verificar simultaneamente a integridade das membranas plasmática e acrossomal, utilizando o citômetro de fluxo BD FACSAria (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA), controlado pelo software BD FACSDiva 6.0. Para esta análise, foram adicionadas às amostras dois conjuntos de sondas fluorescentes: 1) Hoechst 33342, iodeto de propídeo (IP) e aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA), e 2) Hoechst 33342, dihidroetídio (DHE) e YoPro. Os resultados da citometria de fluxo foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido de Teste de Tukey, apresentando nível de significância de 5%. Não houve interação entre tempo e tratamento ($p>0,05$), e nem entre tempo e temperatura ($p>0,05$), porém a interação tratamento e temperatura foi significativa ($p=0,04$) para a variável AIML (acrossoma íntegro e membrana plasmática lesada). Quando consideradas as concentrações do antioxidante, a variável AIMI (acrossoma íntegro e membrana plasmática íntegra) apresentou um percentual maior ($p<0,05$) com 50µM ($79,68 \pm 5,64^a$) comparado ao tratamento com 100µM ($71,36 \pm 5,61^b$). A adição de 100µM do antioxidante aumentou o percentual ($p<0,05$) de ALMI (acrossoma lesado e membrana plasmática íntegra) comparado ao grupo controle ($6,32 \pm 1,48^{ab}$ vs. $8,59 \pm 1,48^a$), bem como para AIML (100µM = $6,22 \pm 0,72^a$ vs. 0µM = $4,15 \pm 0,70^b$). Em relação à ALML (acrossoma lesado e membrana plasmática lesada), a análise mostrou que a concentração de 100µM aumentou o percentual ($p<0,05$; $19,25 \pm 1,89^a$) em relação à 50µM ($12,48 \pm 1,91^b$) e ao grupo controle ($7,50 \pm 1,89^b$). Se considerarmos o tempo, as amostras avaliadas após 96h da diluição apresentaram diferença ($p<0,05$) em relação ao tempo 168h sobre as variáveis ALMI (96h = $8,19 \pm 1,26^a$ vs. 168h = $4,29 \pm 1,26^b$) e IFDHE (intensidade de fluorescência do dihidroetídio) (96h = $8,95 \pm 0,57^a$ vs; 168h = $6,74 \pm 0,57^b$). A temperatura não apresentou efeito significativo ($p>0,05$) sobre as variáveis analisadas. Conclui-se que a concentração de 100 µM comprometeu a integridade dos espermatozoides, enquanto a concentração de 50 µM conferiu maior proteção às membranas celulares.

Palavras-chave: Sêmen. Antioxidante. Motilidade. Andrologia. Inseminação artificial.

Agradecimentos: À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-001), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo 310486/2023-8), à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), e à Bretanha Suínos.

Effect of addition of aqueous preparation of cyanidin 3-glucoside and cyanidin 3-rutinoside on the quality of swine semen stored at different temperatures for 168 hours: simultaneous evaluation of sperm membrane integrity

Guilherme Ferreira da Silva¹; Christian Thiago Gomes Santos¹; Leriana Garcia Reis¹; Gabrielle Souza Primo¹; Isadora Ribeiro de Martino¹; Luan Mendes de Oliveira Bezerra¹; Henricco Zapparoli e Silva¹; Lourdes Maria Corrêa Cabral²; Jorgea Pradié³; André Furugen Cesar de Andrade^{1*}

¹Núcleo de Pesquisa em Suínos – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, São Paulo, Brasil, ²Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, ³Bretanha Suínos, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil

*E-mail: andrefc@usp.br

Cooled semen is widely used in artificial insemination programs on commercial swine farms, representing more than 95% of the insemination techniques used in the country. To ensure greater safety and quality of cooled insemination doses, it is essential to ensure correct processing and storage, from the collection and dilution of the ejaculate, through refrigeration at 17 °C, until the moment of insemination into the gilt and sow's reproductive tract. These steps can represent several threats to the integrity of sperm, considering that the swine sperm cell is highly susceptible to structural damage caused by lipid peroxidation, due to the high proportion of unsaturated fatty acids in its plasma membrane. In this context, the addition of molecules with antioxidant action to the extender is desirable, in order to mitigate possible deleterious effects associated with the dilution and refrigeration process for prolonged periods. It is known that the pulp of juçara (*Euterpe edulis Martius*) contains the anthocyanins cyanidin 3-glucoside and cyanidin 3-rutinoside, which are bioactive compounds with recognized antioxidant activity and plasma membrane protection properties, which could offer benefits to sperm. The objective of this experiment was to evaluate the antioxidant effects of the addition of previously lyophilized juçara pulp on the integrity of the plasma and acrosomal membranes of swine sperm during the storage of diluted semen under two different temperature conditions: room temperature (25°C) and refrigeration (17°C), and in two storage periods: 96 hours and 168 hours. To perform the experiment, seven ejaculates were collected from three commercial hybrid boars and subsequently diluted using the Optimia® extender (Magapor, Spain). The total volume (ejaculate + diluent) was divided into three equal parts, and the antioxidant was added at the following concentrations: 0 µM (control), 50 µM, and 100 µM. After dilution and homogenization, the samples were packaged in previously identified tubes and kept at room temperature for 90 minutes. Subsequently, half of the samples were stored in a refrigerator at 17°C, while the other half remained at room temperature at 25°C. Evaluations were performed to verify the viability and maintenance of sperm cell structures at three different times: immediately after 90 minutes at room temperature; 96 hours after dilution; and 168 hours after dilution. These evaluations sought to simultaneously verify the integrity of the plasma and acrosomal membranes, using a BD FACSAria flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), controlled by BD FACSDiva 6.0 software. For this analysis, two sets of fluorescent probes were added to the samples: 1) Hoechst 33342, propidium iodide (PI) and *Pisum sativum* agglutinin conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC-PSA), and 2) Hoechst 33342, dihydroethidium (DHE) and YoPro. The flow cytometry results were submitted to analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test, presenting a significance level of 5%. There was no interaction between time and treatment ($p>0.05$), nor between time and temperature ($p>0.05$), however the interaction between treatment and temperature was significant ($p=0.04$) for the IADM variable (intact acrosome and damaged plasma membrane). When considering the antioxidant concentrations, the IAIM variable (intact acrosome and intact plasma membrane) showed a higher percentage ($p<0.05$) with 50µM (79.68 ± 5.64^a) compared to the treatment with 100µM (71.36 ± 5.61^b). The addition of 100µM of the antioxidant increased the percentage ($p<0.05$) of DAIM (damaged acrosome and intact plasma membrane) compared to the control group (6.32 ± 1.48^{ab} vs. 8.59 ± 1.48^a), as well as for IADM (100µM = 6.22 ± 0.72^a vs. 0µM = 4.15 ± 0.70^b). Regarding DADM (damaged acrosome and damaged plasma membrane), the analysis showed that the 100µM concentration increased the percentage ($p<0.05$; 19.25 ± 1.89^a) compared to 50µM (12.48 ± 1.91^b) and the control group (7.50 ± 1.89^b). Considering the time, the samples evaluated after 96h of dilution showed difference ($p<0.05$) compared to 168h on the variables DAIM (96h = 8.19 ± 1.26^a vs. 168h = 4.29 ± 1.26^b) and DHEFI (dihydroethidium fluorescence intensity) (96h = 8.95 ± 0.57^a vs. 168h = 6.74 ± 0.57^b). Temperature did not significantly influence ($p>0.05$) the variables evaluated. It is concluded that the concentration of 100µM compromised the integrity of the spermatozoa, while the concentration of 50µM conferred greater protection to the cell membranes.

Keywords: Semen. Antioxidant. Motility. Andrology. Artificial insemination.

Acknowledgements: To Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-001), to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo 310486/2023-8), to Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), and to Bretanha Suínos.

Efeito da adição do preparado aquoso de cianidina 3-glucosídeo e cianidina 3-rutinosídeo sobre a cinética do espermatozoide suíno armazenado em diferentes temperaturas por 168 horas

Luan Mendes de Oliveira Bezerra¹, Christian Thiago Gomes Santos¹, Leriana Garcia Reis¹, Henricco Zapparoli¹, Isadora Ribeiro de Martino¹, Guilherme Ferreira da Silva¹, Gabrielle Souza Primo¹, Rosa Daniela Palchucan Nieto¹, Lourdes Maria Corrêa Cabral², Leonila Ester Reinert Raspatini³, André Tadeu Gotardo³, André Furugen Cesar de Andrade^{1*}

¹Núcleo de Pesquisa em Suínos – Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, São Paulo, Brasil; ²Embrapa Agroindústria de Alimentos – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Guaratiba, Rio de Janeiro, Brasil; ³Centro de Pesquisa em Toxicologia Veterinária (CEPTOX) – Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, 13635-900, Brasil

*e-mail: andrefc@usp.br

A inseminação artificial é amplamente utilizada no manejo reprodutivo de suínos, permitindo que um único macho de alto valor genético fertilize um número maior de fêmeas. No entanto, a diluição dos espermatozoides em meio de refrigeração não previne processos oxidativos que reduzem a capacidade de fertilização das células espermáticas, uma vez que a peroxidação lipídica da membrana plasmática e mitocondrial continua a ocorrer, afetando a fluidez da membrana e o metabolismo energético que influenciam a viabilidade e a motilidade dos espermatozoides. Neste sentido, a busca por substâncias que possam diminuir essa oxidação está sendo investigadas para aumentar a proteção dos espermatozoides e consequentemente seu tempo de viabilidade. Este estudo investigou os efeitos de duas antocianinas (compostos correlacionados com forte inibição de oxidação: a cianidina 3-glucosídeo e a cianidina 3-rutinosídeo, retiradas da palmeira Juçara e liofilizados) na cinética de espermatozoides armazenados à 17 ou a 25 °C por até 168 horas. Além disso, foram testadas diferentes temperaturas de armazenamento com o foco de avaliar a capacidade de um diluidor conservar a viabilidade desses espermatozoides em temperatura ambiente (25 °C). Neste sentido, 7 amostras de sêmen foram diluídas com diferentes concentrações dos antioxidantes (0µM, 50µM e 100µM) em forma aquosa em um diluidor de média duração (Optimia®, Bretanha, Passo Fundo/RS, Brasil). Os resultados foram avaliados em dois momentos: após 96 horas e após 168 horas de refrigeração. As cianidinas não forneceram melhorias significativas em comparação ao grupo controle (0µM). Para a análise estatística, os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$, e indicaram que quanto maior a concentração adicionada de cianidina 3-glucosídeo e cianidina 3-rutinosídeo menor as motilidades total TMOT (0µM: $83.0378 \pm 7.7276a$), (50µM: $58.8438 \pm 7.7276b$), (100µM: $44.2867 \pm 7.7276c$) e progressiva PMOT (0µM: $62.8299 \pm 7.1698a$), (50µM: $35.6106 \pm 7.1698b$), (100µM: $21.8153 \pm 7.1698c$) dos espermatozoides, além de diminuir outros parâmetros avaliados pelo sistema CASA: VAP (0µM: $37.2986 \pm 4.4114a$), (50µM: $28.2157 \pm 4.4114b$), (100µM: $20.3657 \pm 4.4114c$), VSL (0µM: $21.9782 \pm 3.0794a$), (50µM: $18.7807 \pm 3.0794a$), (100µM: $12.9924 \pm 3.0794b$), VCL (0µM: $60.5779 \pm 5.5563a$), (50µM: $45.3826 \pm 5.5563b$), (100µM: $35.6683 \pm 5.5563c$) e ALH (0µM: $2.773 \pm 0.2697a$), (50µM: $2.4597 \pm 0.2697a$), (100µM: $2.0369 \pm 0.2697b$), no entanto apesar da diferença numérica, não houve diferença estatística quanto as diferentes temperaturas de armazenamento com TMOT (16°C: 65.4628 ± 7.4385), (25°C: 58.6494 ± 7.4385), PMOT (16°C: 43.4483 ± 6.9015), (25°C: 36.7223 ± 6.9015), VAP (16°C: 29.6123 ± 4.2463), (25°C: 27.6411 ± 4.2463), VSL (16°C: 18.8645 ± 2.9642), (25°C: 16.9697 ± 2.9642), VCL (16°C: 48.1203 ± 5.3484), (25°C: 46.2989 ± 5.3484) e ALH (16°C: 2.464 ± 0.2596), (25°C: 2.3824 ± 0.2596), e nem quanto ao tempo de armazenamento com TMOT (96h: 64.6459 ± 7.4385), (168h: 59.4663 ± 7.4385), PMOT (96h: 41.9794 ± 6.9015), (168h: 38.1911 ± 6.9015), VAP (96h: 29.6077 ± 4.2463), (168h: 27.6456 ± 4.2463), VSL (96h: 17.8688 ± 2.9642), (168h: 17.9654 ± 2.9642), VCL (96h: 47.557 ± 5.3484), (168h: 46.8622 ± 5.3484) e ALH (96h: 2.3843 ± 0.2596), (168h: 2.4621 ± 0.2596). Essas descobertas sugerem a necessidade de explorar outras concentrações e combinações de antioxidantes para otimizar a preservação dos espermatozoides durante o armazenamento refrigerado, uma vez que as concentrações utilizadas diminuíram as funções espermáticas avaliadas.

Palavras-chave: refrigeração, antioxidantes, qualidade do sêmen suíno diluído, motilidade

Agradecimentos: À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-2022/09573-2), à CAPES (Código de Financiamento 001) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 310486/2023-8).

Effect of Aqueous Cyanidin 3-Glucoside and Cyanidin 3-Rutinoside Supplementation on the Kinetics of Boar Spermatozoa Stored at Different Temperatures for 168 Hours

Luan Mendes de Oliveira Bezerra¹, Christian Thiago Gomes Santos¹, Leriana Garcia Reis¹, Henricco Zapparoli¹, Isadora Ribeiro de Martino¹, Guilherme Ferreira da Silva¹, Gabrielle Souza Primo¹, Rosa Daniela Palchucan Nieto¹, Lourdes Maria Corrêa Cabral², Leonila Ester Reinert Raspatini², André Tadeu Gotardo², André Furugen Cesar de Andrade^{1*}

¹Swine Research Center – University of São Paulo (USP), Pirassununga, São Paulo, Brazil; ²Embrapa Food Technology, Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil; ³Veterinary Toxicology Research Center (CEPTOX) – Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, Pirassununga, SP, 13635-900, Brazil

*E-mail: andrefc@usp.br

Artificial insemination is widely used in swine reproductive management, allowing a single male with high genetic value to fertilize a larger number of females. However, the dilution of spermatozoa in a refrigeration medium does not prevent oxidative processes that reduce the fertilizing capacity of sperm cells, since lipid peroxidation of the plasma and mitochondrial membranes continues to occur, affecting membrane fluidity and energy metabolism, which influence sperm viability and motility. In this regard, the search for substances that can reduce this oxidation is being investigated in order to increase sperm protection and, consequently, their viability period. This study investigated the effects of two anthocyanins (compounds associated with strong oxidative inhibition: cyanidin 3-glucoside and cyanidin 3-rutinoside, extracted from the Juçara palm and lyophilized) on the kinetics of spermatozoa stored at 17°C or 25°C for up to 168 hours. In addition, different storage temperatures were tested with the aim of evaluating the ability of an extender to preserve sperm viability at room temperature (25°C). In this context, seven semen samples were diluted with different concentrations of the antioxidants (0 µM, 50 µM, and 100 µM) in aqueous form using a medium-term extender (Optimia®, Bretanha, Passo Fundo/RS, Brazil). The results were evaluated at two time points: after 96 hours and after 168 hours of refrigeration. The anthocyanins did not provide significant improvements compared to the control group (0 µM). For statistical analysis, results were considered significant when $p < 0.05$, and it was observed that the higher the concentration of added cyanidin 3-glucoside and cyanidin 3-rutinoside, the lower the total motility TMOT (0 µM: $83.0378 \pm 7.7276a$), (50 µM: $58.8438 \pm 7.7276b$), (100 µM: $44.2867 \pm 7.7276c$) and progressive motility PMOT (0 µM: $62.8299 \pm 7.1698a$), (50 µM: $35.6106 \pm 7.1698b$), (100 µM: $21.8153 \pm 7.1698c$) of spermatozoa. These compounds also reduced other parameters evaluated by the CASA system: VAP (0 µM: $37.2986 \pm 4.4114a$), (50 µM: $28.2157 \pm 4.4114b$), (100 µM: $20.3657 \pm 4.4114c$), VSL (0 µM: $21.9782 \pm 3.0794a$), (50 µM: $18.7807 \pm 3.0794a$), (100 µM: $12.9924 \pm 3.0794b$), VCL (0 µM: $60.5779 \pm 5.5563a$), (50 µM: $45.3826 \pm 5.5563b$), (100 µM: $35.6683 \pm 5.5563c$), and ALH (0 µM: $2.773 \pm 0.2697a$), (50 µM: $2.4597 \pm 0.2697a$), (100 µM: $2.0369 \pm 0.2697b$). However, despite numerical differences, no statistically significant effect was observed between storage temperatures for TMOT (16°C: 65.4628 ± 7.4385), (25°C: 58.6494 ± 7.4385), PMOT (16°C: 43.4483 ± 6.9015), (25°C: 36.7223 ± 6.9015), VAP (16°C: 29.6123 ± 4.2463), (25°C: 27.6411 ± 4.2463), VSL (16°C: 18.8645 ± 2.9642), (25°C: 16.9697 ± 2.9642), VCL (16°C: 48.1203 ± 5.3484), (25°C: 46.2989 ± 5.3484), and ALH (16°C: 2.464 ± 0.2596), (25°C: 2.3824 ± 0.2596), nor between storage durations for TMOT (96h: 64.6459 ± 7.4385), (168h: 59.4663 ± 7.4385), PMOT (96h: 41.9794 ± 6.9015), (168h: 38.1911 ± 6.9015), VAP (96h: 29.6077 ± 4.2463), (168h: 27.6456 ± 4.2463), VSL (96h: 17.8688 ± 2.9642), (168h: 17.9654 ± 2.9642), VCL (96h: 47.557 ± 5.3484), (168h: 46.8622 ± 5.3484), and ALH (96h: 2.3843 ± 0.2596), (168h: 2.4621 ± 0.2596). These findings suggest the need to explore other concentrations and combinations of antioxidants to optimize sperm preservation during refrigerated storage, since the concentrations used in this study negatively affected the evaluated sperm functions.

Keywords: refrigeration; antioxidants; diluted boar semen quality; motility

Acknowledgments: To the São Paulo Research Foundation (FAPESP – 2022/09573-2), CAPES (Funding Code 001), and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq – 310486/2023-8).

Inhibition of Sperm-Induced NETosis by Antioxidants and Seminal Plasma Components in Porcine In Vitro Co-cultures

^{1,2}Felipe Pezo Fonseca, ^{3,4}Fabiola Zambrano Quezada, ⁵André Furugen Cesar de Andrade, ^{4,6}Rodrigo Rivera Concha, ^{4,7}Pamela Uribe Catalán, ¹Rebeca Choque Martínez, ¹Ana Carrasco Reumay, ¹Sofia Palma Monsalve, ¹Cristóbal Nahuelpán Yáñez, ^{2,4,*}Raúl Sánchez Gutiérrez

¹Facultad de Ciencias Agropecuarias y Medioambiente, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile; ²Center of Excellence in Reproductive Biotechnology (BIOREN-CEBIOR), Faculty of Medicine, University of La Frontera, Temuco, Chile; ³Department of Preclinical Sciences, Faculty of Medicine, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile; ⁴Center of Excellence in Translational Medicine and Scientific and Technological Bioresource Nucleus (CEMT-BIOREN), Faculty of Medicine, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile; ⁵Swine Research Center, Department of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil. ⁶Ph.D. Program in Medical Sciences, Faculty of Medicine, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. ⁷Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile

*E-mail: raul.sanchez@frontera.cl

Neutrophil extracellular traps (NETs) are web-like DNA structures released during a specialized form of cell death known as NETosis. While NETs play a key role in host defense, excessive or misregulated NETosis can negatively impact sperm quality by promoting oxidative stress, motility loss, and DNA damage. Recent studies have shown that spermatozoa can actively induce NETosis, potentially compromising reproductive outcomes. The objective of the study was to evaluate the modulatory effects of different concentrations of prostaglandin E₂ (PGE₂; 10, 50 and 100 µM), bovine serum albumin (BSA; 0.5, 1 and 1.5 % vol/vol), Butylhydroxytoluene (BHT; 0.5, 1 and 1.5 mM) and seminal plasma (SP; 10, 15 and 20 % vol/vol) added to the Beltsville Thawing Solution (BTS) on thawed boar sperm function and NETs formation in sow's neutrophils exposed to thawed sperm. To evaluate the effect of supplemented BTS on thawed sperm functionality, viability, cholesterol flow, mitochondrial membrane potential (MMP), and peroxynitrite levels were evaluated by flow cytometry after 60 min of incubation at 38 °C. To evaluate NETs formation, co-cultures of neutrophils and thawed sperm were established at a cell ratio of 1:3 (PMN:sperm) and co-incubated for 1 hour at 37°C. Following incubation, the co-cultures were stained with Sytox Orange for 15 minutes to assess the formation of neutrophil extracellular traps (NETs). Samples were analyzed using the TissueFAXS i Plus system (FONDEQUIP EQM200228). Neutrophil nuclear sizes were quantified, and cells exhibiting nuclear areas greater than 60 µm² were classified as NETotic. This threshold was used to determine the percentage of NET-forming neutrophils within the co-culture. To analyze data from flow cytometry experiments and for the quantification of NETotic cells, data were transformed to a logarithmic scale and analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. Differences were considered statistically significant at P < 0.05. No significant differences were observed supplemented BTS on thawed boar sperm membrane fluidity and MMP at any of the concentrations used, however, a significant reduction on peroxynitrite levels were observed for all concentrations of BSA and PS and a significant viability preservation was detected for the highest concentration of PS (41.6±5.4%) compared to the control group (28.7±8.3%). Also, in this study, we demonstrate that thawed boar sperm trigger NET formation *in vitro* when co-cultured with neutrophils. BHT at 0.5 mM, PGE₂ at 10 µM, BSA at 0.5%, and SP at concentrations between 10–20% effectively reduced NETosis levels in these co-cultures. These findings highlight the potential of BSA and SP to reduce nitrosative stress on thawed boar sperm while, the use of BHT, PGE₂, BSA and SP components can modulate neutrophil responses and protect sperm from immune-mediated damage, offering new insights into mechanisms that safeguard fertility in porcine species.

Keywords: NETs, boar sperm, cryopreservation, neutrophils

Acknowledgements: This work was supported by the Fundación de Apoyo a la Investigación del Estado de Sao Paulo (FAPESP), Brasil y la Universidad de La Frontera (UFRO), Chile, (Grant number FPP22-0022 to R.S and A.F.C.; Grant number FAPESP 2022/09573-2 to A.F.C. and R.S.), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq - 310486/2023-8), Fondo Nacional de Investigación Científica y Tecnológica, Chile (Grant number 11250694 to F.P.) and Project DI24-0114 of the Dirección de Investigación de la UFRO, Temuco, Chile.

Inibição da NETose induzida por espermatozóides com o uso de antioxidantes e componentes do plasma seminal em co-culturas *in vitro* de suínos

^{1,2}Felipe Pezo Fonseca, ^{3,4}Fabiola Zambrano Quezada, ⁵André Furugen Cesar De Andrade, ^{4,6}Rodrigo Rivera Concha, ^{4,7}Pamela Uribe Catalán, ¹Rebeca Choque Martínez, ¹Ana Carrasco Reumay, ¹Sofia Palma Monsalve, ¹Cristóbal Nahuelpán Yáñez, ^{2,4*}Raúl Sánchez Gutiérrez

¹Faculdade de Ciências Agropecuárias e Meioambientes, Universidade de La Frontera, Temuco, Chile; ²Centro de Excelência em Biotecnologia Reprodutiva (BIOREN-CEBIOR), Faculdade de Medicina, Universidade de La Frontera, Temuco, Chile; ³Departamento de Ciências Pré-clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de La Frontera, Temuco, Chile; ⁴Centro de Excelência em Medicina Translacional e Núcleo de Biorecursos Científicos e Tecnológicos (CEMT-BIOREN), Faculdade de Medicina, Universidade de La Frontera, Temuco, Chile; ⁵Núcleo de Pesquisa em Suínos, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. ⁶Ph.D. Programa em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidad de La Frontera, ⁷Departamento de Medicina Interna, Faculdade de Medicina, Universidade de La Frontera, Temuco, Chile

*E-mail: raul.sanchez@frontera.cl

As armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) são estruturas de DNA semelhantes a teias liberadas durante uma forma especializada de morte celular conhecida como NETose. Embora as NETs desempenhem um papel fundamental na defesa do hospedeiro, a NETose excessiva ou mal regulada pode impactar negativamente a qualidade do sêmen, promovendo estresse oxidativo, perda de motilidade e danos ao DNA. Estudos recentes mostraram que os espermatozoides podem induzir ativamente a NETose, comprometendo potencialmente os resultados reprodutivos. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos modulatórios de diferentes concentrações de prostaglandina E₂ (PGE₂; 10, 50 e 100 µM), albumina sérica bovina (BSA; 0,5, 1 e 1,5% vol/vol), butil-hidroxitolueno (BHT; 0,5, 1 e 1,5 mM) e plasma seminal (SP; 10, 15 e 20% vol/vol) adicionados ao diluente BTS na função dos espermatozóides descongelados de cachorros e na formação de NETs no útero de porcas expostas a este mesmo sêmen. Para avaliar o efeito do BTS suplementado na funcionalidade do sêmen descongelado, a viabilidade, o fluxo de colesterol, o potencial de membrana mitocondrial (MMP) e os níveis de peroxinitrito foram avaliados por citometria de fluxo após 60 min de incubação a 38 °C. Para avaliar a formação de NETs, co-culturas de neutrófilos e espermatozoides descongelados foram estabelecidas em uma proporção de células de 1:3 (PMN:espermatozoides) e co-incubadas por 1 hora a 37°C. Após a incubação, as co-culturas foram coradas com Sytox Orange por 15 minutos para avaliar a formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). As amostras foram analisadas usando o sistema TissueFAXS i Plus (FONDEQUIP EQM200228). Os tamanhos nucleares dos neutrófilos foram quantificados, e as células que exibiam áreas nucleares maiores que 60 µm² foram classificadas como NETóticas. Este limite foi usado para determinar a porcentagem de neutrófilos formadores de NETs dentro da co-cultura. Para analisar os dados dos experimentos de citometria de fluxo e para a quantificação de células NETóticas, os dados foram transformados a uma escala logarítmica e analisados por ANOVA unidirecional seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando P < 0,05. Nenhuma diferença significativa foi observada na fluidez da membrana do espermatozóide de cachorro descongelado e na MMP em nenhum dos tratamentos, e em nenhuma das concentrações propostas no experimento. No entanto, uma redução significativa nos níveis de peroxinitrito foi observada para todas as concentrações de BSA e PS e uma preservação significativa da viabilidade foi detectada para a maior concentração de PS (41.6±5.4%) em comparação ao grupo controle (28.7±8.3%). Além disso, neste estudo, demonstramos que o espermatozóide descongelado de cachorros desencadeia a formação de NET *in vitro* quando co-cultivado com neutrófilos. BHT a 0,5 mM, PGE₂ a 10 µM, BSA a 0,5% e SP em concentrações entre 10–20% reduziram efetivamente os níveis de NETose nessas co-culturas. Essas descobertas destacam o potencial de BSA e SP para reduzir o estresse nitrosativo no sêmen descongelado de cachorros, enquanto o uso dos componentes BHT, PGE₂, BSA e SP pode modular as respostas dos neutrófilos e proteger os espermatozóides de danos imunomediados, oferecendo novos insights sobre os mecanismos que protegem a fertilidade na espécie suína.

Palavras-chave: NETs, sêmen de cachorro, criopreservação, neutrófilos

Agradecimentos: Este trabalho foi financiado pela Fundación de Apoyo a la Investigación del Estado de Sao Paulo (FAPESP), Brasil y la Universidad de La Frontera (UFRO), Chile, (número de concessão FPP22-0022 para R.S e A.F.C.; número de bolsa FAPESP 2022/09573-2 para A.F.C. e R.S.), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 310486/2023-8), Fondo Nacional de Investigación Científica y Tecnológica, Chile (número de concessão 11250694 para F.P.) e Projeto DI24-0114 da Dirección de Investigación da UFRO, Temuco, Chile.