

COMPONENTES MOLECULARES ENVOLVIDOS NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN SUÍNO

(Molecular components involved in cryopreservation of swine semen)

Ricardo TONIOLLI^{1*}; Daianny Barboza GUIMARÃES²; Lina Raquel Santos ARAÚJO¹

¹Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen (LRSTS/UECE), Av. Dr. Silas Munguba, 1700. Campus do Itaperi, Fortaleza/CE. CEP: 60.740-000; ²Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO, CE). *E-mail: ricardo.toniolli@uece.br

RESUMO

A criopreservação induz mudanças estruturais e funcionais nos espermatozoides, que podem variar entre animais da mesma espécie, mesmo quando o sêmen deles é submetido ao mesmo protocolo de criopreservação. Essa característica leva alguns estudos a questionarem quanto à composição protéica do sêmen e sua influência na proteção espermática, em relação ao choque térmico. O plasma seminal de suínos apresenta predominância de espermadesinas, que são proteínas de baixo peso molecular e apresentam função de proteção da membrana plasmática. A criopreservação é o método mais eficiente para a conservação de espermatozoides a longo prazo. No entanto, o uso do sêmen congelado na espécie suína ainda está associado a baixos índices produtivos, pois o processo de criopreservação ocasiona diversos danos ao espermatozoide. Estudos têm sido realizados com a finalidade de identificar as causas específicas desses danos, a fim de promover uma melhor proteção ao espermatozoide criopreservado. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo abordar os principais componentes moleculares do sêmen, que estão envolvidos no processo de criopreservação.

Palavras-chave: Espermatozoide, lesões, membrana plasmática, proteínas.

ABSTRACT

Cryopreservation induces structural and functional changes in the spermatozoa, which may vary between animals of the same species, even when their semen is subjected to the same cryopreservation protocol. This feature leads some studies to question the semen protein composition and its influence on sperm protection in relation to the thermal shock. Swine seminal plasma presents predominance of spermadesins, which are low molecular weight proteins and present a protective function of the plasmatic membrane. Cryopreservation is the most efficient method for long-term sperm conservation. However, the use of frozen semen in swine species is still associated with low productive indexes because the cryopreservation process causes several damages to the spermatozoid. Studies have been carried out with the purpose of identifying specific causes of this damage in order to promote a better protection of the cryopreserved spermatozoa. In this way, the present work aimed to address the main molecular components of semen that are involved in the cryopreservation process.

Key words: Spermatozoa, lesions, plasma membrane, proteins.

INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen é uma técnica utilizada no ramo da reprodução animal e tem por finalidade promover a conservação das células espermáticas, por um período indeterminado. No entanto, o sucesso dessa técnica depende de vários fatores, incluindo a qualidade inicial das amostras de sêmen, o protocolo de criopreservação e a resistência dos espermatozoides quanto aos estresses térmicos, mecânicos e osmóticos, durante o resfriamento e a congelamento (HOLT *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2013).

No geral, o processo de congelamento/descongelamento de espermatozoides, de mamíferos, causa diversos danos à célula, que podem se propagar de acordo com a espécie animal e está diretamente relacionado com a capacidade do espermatozoide de resistir aos

procedimentos que visam a criopreservação (KOPEIKA *et al.*, 2015). Essa variação ocorre entre animais de espécies diferentes, mas, também, entre animais da mesma espécie, o que leva, então, à necessidade de se considerar a origem genética do animal como um fator dependente para a proteção espermática, após a congelação (THURSTON *et al.*, 2002).

Em suínos, os resultados obtidos com o uso do sêmen criopreservado são bastante insatisfatórios e estão relacionados com o fato do espermatozoide, dessa espécie, ser bastante sensível a baixas temperaturas. No entanto, a resistência das células espermáticas, parecem ser mais dependentes de características intrínsecas do próprio animal do que do processo de criopreservação em si (MEDRANO *et al.*, 2009; PRIETO-MARTINEZ *et al.*, 2017). Nem todos os animais apresentam resultados ruins para a criopreservação, o que permite classificá-los, através de seus ejaculados, como reprodutores com sêmen de boa ou de má congelabilidade (CASAS *et al.*, 2009; TONIOLLI *et al.*, 2017).

Uma particularidade observada nos protocolos de criopreservação, é o fato de que cada reprodutor que apresenta bons resultados de congelação do seu sêmen mantém essa qualidade com o sêmen oriundo de outros ejaculados. Dessa forma, entende-se que um animal que apresentou uma boa congelabilidade tem uma tendência natural de sempre apresentar bons resultados de criopreservação de seu sêmen. A constatação dessa característica levou pesquisadores a considerar a possibilidade de uma origem genética como um fator dependente para a proteção espermática, durante o período de criopreservação do sêmen de um determinado reprodutor (THURSTON *et al.*, 2002).

Com isso, vários estudos vêm sendo realizados com a finalidade de obter um maior conhecimento a respeito da base molecular do sêmen, da identificação de proteínas e da intensidade com que elas estão expressas no plasma seminal (MOURA *et al.*, 2007), e de correlacionar esse conhecimento com a proteção espermática após a criopreservação (GUIMARÃES *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2018; RECUERO *et al.*, 2019). A presente revisão aborda os principais componentes moleculares do sêmen envolvidos na criopreservação.

DESENVOLVIMENTO

Os constituintes do plasma seminal

O sêmen do suíno pode ser dividido em quatro fases distintas, sendo elas a uretral, a rica, a pobre e a gelatinosa. A fase das glândulas uretrais consiste nos primeiros 10 a 15mL liberados e tem a função de adequar o canal da uretra para a passagem dos espermatozoides. Já a fase rica contém cerca de 70% dos espermatozoides do ejaculado, o que lhe proporciona um aspecto leitoso. A fase pobre, que apresenta um aspecto soroso, contém o restante dos espermatozoides do ejaculado. Essas duas fases do ejaculado, a rica e a pobre, são aproveitadas para a análise e posterior conservação do sêmen. Por último, a fase gelatinosa, que é composta pela secreção das glândulas bulbo-uretrais (BORTOLOZZO *et al.*, 2005).

O plasma seminal é o produto das secreções das glândulas sexuais acessórias (próstata, glândula vesicular e glândulas bulbouretrais), dos epidídimos e dos condutos deferentes localizados no trato reprodutivo do macho, que se integram aos espermatozoides no momento da ejaculação (EVANS e MAXWELL, 1990). O plasma contém muitos componentes orgânicos e inorgânicos que desempenham ações variadas, tanto no trato reprodutivo masculino, por promover a maturação do espermatozoide, bem como no trato

reprodutivo feminino, o qual é responsável por desencadear a capacitação espermática, sendo então essencial para a manutenção da qualidade seminal visando a fertilidade (FOXCROFT *et al.*, 2008).

Em resumo, as proteínas presentes no plasma seminal de suínos são moléculas de alto peso molecular, que exercem funções relacionadas com a espermatogênese, a maturação, o transporte de espermatozoides, a sobrevivência destes no trato reprodutivo feminino, a capacitação e reação acrossômica, o reconhecimento entre o espermatozoide e o ovócito e a proteção contra microorganismos e danos oxidativos (NOVAK *et al.*, 2010).

O evento da fertilização nos mamíferos inclui interações bioquímicas altamente reguladas, tais como: ligação de proteínas seminais na superfície dos espermatozoides durante a ejaculação; interação de proteínas da membrana espermática com células epiteliais do oviduto; capacitação espermática; reconhecimento dos gametas; reação acrossômica; penetração do espermatozoide na zona pelúcida e fusão dos gametas (STRZEZEK *et al.*, 2005).

Sabe-se que o plasma seminal é composto por aminoácidos, açúcares, minerais, fosfatases, prostaglandinas e proteínas que influenciam o processo de transporte espermático do trato reprodutivo do macho até o sítio de fecundação, no terço superior da trompa uterina da fêmea (STRZEZEK, 2002), além de proverem fonte de energia para as células espermáticas (CENTURION *et al.*, 2003; CABALLERO *et al.*, 2008).

Além de proteínas, há açúcares, tais como glicose e frutose, que atuam como fonte de energia, onde, na célula, são armazenadas sob a forma de adenosina trifosfato (ATP), permitindo a manutenção da motilidade espermática (MUKAI e OKUNO, 2004). As maiores produtoras de ATP na célula espermática são as mitocôndrias, localizadas na peça intermediária, formando a bainha mitocondrial e produzindo adenosina trifosfato para a célula, através de respiração aeróbica. O axonema espermático possui uma demanda elevada de ATP como fonte de energia para promover a motilidade flagelar. Devido à restrição do número de mitocôndrias espermáticas na peça intermediária, o ATP produzido por essas mitocôndrias deve percorrer uma considerável distância para suprir as necessidades do axonema localizado em segmentos mais distais do flagelo (TURNER, 2003).

Existem também, no plasma, moléculas como o bicarbonato, que aumenta o pH intracelular, estimula a atividade respiratória e facilita a abertura dos canais de cálcio, fundamentais para a capacitação espermática (JAISWAL e CONTI, 2001).

Há evidências de que o bicarbonato facilita a desorganização da membrana plasmática, principalmente na região apical da cabeça do espermatozoide (GADELLA e COLENBRANDER, 2003). Sendo assim, foi sugerido que a capacitação das células espermáticas fosse dependente de bicarbonato, supostamente presente em níveis maiores na tuba uterina (20mM) do que no fluido espermático (<1mM) (FLESCH e GADELLA, 2000).

O bicarbonato estimula uma forma solúvel de adenilciclase (AC), abundante nos espermatozoides, resultando no aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPC), que ativa uma proteína quinase A (PKA) e que, por sua vez, induz a fosforilação de tirosina, de vários substratos (GADELLA e COLENBRANDER, 2003). Em consequência, as proteínas da membrana plasmática, relacionadas com a ligação na zona pelúcida, tornam-se ativas, promovendo, assim, a capacitação espermática.

Além desses componentes presentes no plasma, há também, a presença de diversas enzimas, que funcionam, em sua grande maioria, como agentes antioxidantes, prevenindo a peroxidação dos lipídeos de membrana pelas espécies reativas ao oxigênio e, conseqüentemente, a fragmentação do DNA espermático (YESTE, 2017). A catalase, o superóxido dismutase (SOD) e o sistema glutatona peroxidase/redutase (GPx/GRD) são as principais enzimas com ação antioxidante encontradas no sêmen (ALMEIDA, 2006).

Os constituintes da membrana plasmática

A espermatogênese é um processo no qual ocorre sucessivas mitoses e meioses nas células germinativas, resultando na formação do espermatozoide, que é uma célula altamente diferenciada e especializada na sua estrutura e na função (BOERKE *et al.*, 2007).

Quanto à estrutura do espermatozoide, essa é dividida em cabeça e cauda. Na parte da cabeça, apresenta o núcleo, algumas estruturas do citoesqueleto, o citoplasma e o acrossoma, o qual apresenta enzimas hidrolíticas (NEILL, 2006). Já a cauda, apresenta a peça intermediária e o flagelo (HAFEZ e HAFEZ, 2003).

Na peça intermediária existe grande número de mitocôndrias, que se encontram dispostas em forma de hélice, com a função de produzir a energia necessária para a motilidade espermática (EDDY e O'BRIEN, 1994). O axonema, uma estrutura complexa composta por duas proteínas principais, a dineína e a tubulina (ALBERTS, 2004), está envolvido no mecanismo de motilidade espermática. Esse apresenta nove pares de microtúbulos periféricos, além da presença de um par central. Para ação direta desse movimento a dineína e a tubulina utilizam adenosina trifosfato (ATP), a qual é produzida através das mitocôndrias presentes na peça intermediária (HAFEZ, 1995).

A membrana plasmática envolve toda a estrutura do espermatozoide, ou seja, tanto a cabeça, quanto a peça intermediária e o flagelo estão cobertos por ela, podendo variar apenas quanto à sua composição proteica nas diferentes porções da célula espermática (DE JONGEE e BARRATT, 2006).

A membrana espermática apresenta uma bicamada lipídica com proteínas integrais e periféricas, glicoproteínas e glicolipídios que juntos estão organizados em um mosaico fluido (LEHNINGER *et al.*, 2005).

Os lipídios de membrana mais abundantes são os fosfolipídios, predominantemente fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e esfingomiélna, compostos de uma cabeça polar e duas caudas de hidrocarboneto de característica hidrofóbica. As diferenças no comprimento e na saturação da cauda de ácidos graxos são importantes, pois influenciam na habilidade de agrupamento das moléculas de fosfolipídios, afetando, conseqüentemente, a fluidez da membrana (ALBERTS *et al.*, 2004). A membrana apresenta uma composição mista dos fosfolipídios, que pode diferir de espécie para espécie (BUHR *et al.*, 1994).

Há também, a presença de colesterol, que preenche os espaços entre as cadeias de ácidos graxos de fosfolipídios e tem a função de regular a fluidez da membrana, proporcionando então estabilidade à mesma (LEE *et al.*, 2015; LONE, 2018). A proporção de colesterol e de fosfolipídios, assim como a natureza dos fosfolipídios e a temperatura do meio, determinam a fluidez da membrana. Em geral, quanto mais colesterol presente menos flexível ou menos fluida é a porção da membrana (AMANN e GRAHAM, 1993). Por isso, diversos

estudos têm relacionado a proporção entre colesterol e fosfolipídios na membrana plasmática e comparando esses resultados com a capacidade do espermatozoide em resistir ao choque térmico (CHUAYCHU-NOO *et al.*, 2017; SALMON *et al.*, 2017).

Uma vez que a relação entre colesterol e fosfolipídios determina a fluidez da membrana, espécies que possuem maior quantidade de colesterol apresentam menores danos à membrana, causados pela redução da temperatura (LONE, 2018). Dentre os mamíferos, o suíno é a espécie que apresenta menor relação de colesterol e fosfolipídios, com 0,2 (PARKS e GRAHAM, 1992), quando comparado com os 0,85 em ovinos (HOLT e NORTH, 1985), os 0,83 em humanos (MACK *et al.*, 1986), os 0,36 em equinos (AMANN e GRAHAM, 1993) e os 0,51 em bovinos (PARKS e GRAHAM, 1992). Por esse motivo, os espermatozoides são menos resistentes ao choque térmico, o que explica o fato deles serem tão sensíveis nas espécies suína e equina, quando submetidos a baixas temperaturas (MOCÉ e GRAHAM, 2006; LONE, 2018).

A criopreservação e seus danos à célula espermática

A criopreservação do sêmen é um processo complexo, visto que o espermatozoide é submetido à redução de temperatura, à desidratação celular, à congelação e à descongelação, antes de ser utilizado. Durante esse processo, ocorrem alterações nas características da membrana espermática, podendo ocasionar danos à célula e, como consequência, uma redução do poder de fecundação, quando comparado com sêmen refrigerado (MEDEIROS *et al.*, 2002; YESTE, 2017).

A criopreservação é uma biotecnologia de grande importância, por superar o limite temporal no uso do sêmen, visto que a baixa temperatura reduz drasticamente o metabolismo celular, permitindo a conservação a longo prazo do espermatozoide. Mas, um dos principais problemas que ocorrem no procedimento de congelação-descongelação é a crio-injúria, ocasionada pela mudança de fase da água intracelular e extracelular devido à baixa temperatura (GAO e CRITSER, 2000; YESTE, 2017; NESCI *et al.*, 2020).

Esse dano, pode ser superado caso se utilize a velocidade ideal para o processo de redução de temperatura, visto que uma curva de refrigeração muito lenta promove um excesso de desidratação celular e, conseqüentemente, ocasiona ruptura de membrana. Já uma refrigeração mais rápida previne a célula quanto a esses danos, mas aumenta a possibilidade de formação de cristais de gelo intracelular (AZEVEDO *et al.*, 2000).

O estresse inicial da criopreservação se dá no momento da mudança de temperatura que o espermatozoide é submetido até atingir 5 °C, que é o momento em que ocorre a fase de transição da membrana plasmática de estado líquido cristalino para o estado de gel (MEDEIROS *et al.*, 2002).

De fato, uma vez que diferentes lipídios da membrana apresentam diferentes temperaturas de transição, alguns fosfolipídios insaturados são gelificados mais cedo que outros e são levados a separações de fases. Essa faixa crítica de temperatura ocorre no processo de refrigeração entre 15 e 8 °C, em que o espermatozoide pode ser severamente lesionado (MORAN *et al.*, 1992). O resfriamento, nessa faixa de temperatura, faz com que os lipídeos da membrana plasmática passem por uma fase de transição do estado líquido-cristalino para o estado gel (GRAHAM, 1996). Nesse ponto as cadeias de ácidos graxos, que estavam aleatoriamente distribuídas, ordenam-se paralelamente, produzindo uma estrutura

rígida e tornando essas áreas fracas e suscetíveis a rupturas e a fusões, como também permeáveis a íons (HAMMERSTEDT *et al.*, 1990).

Após esse fenômeno de transição da membrana, as proteínas integrais de membrana se tornam irreversivelmente agrupadas por separações de fase lipídica, os lipídios de membrana são reestruturados e pode ocorrer a perda de algumas moléculas de colesterol presentes na membrana (VADNAIS e ALTHOUSE, 2011).

Outro momento de efluxo de colesterol é quando ocorre a separação dos espermatozoides com o plasma seminal. Esse fenômeno parece ser determinado pela ação de moléculas lipofílicas do meio, como albumina e lipoproteínas. A perda do colesterol permite o aumento do pH intracelular (de 6,7 para 6,92), promovendo a capacitação e, conseqüentemente, a reação acrossomal. Há elevação das concentrações de bicarbonato intracelular, implicando no aumento da concentração de íons de cálcio e na ativação da adenilato ciclase, que converte o ATP em AMPc, ativando a PKA e fosforilizando a tirosina (KOTHARI *et al.*, 2010).

Como resultado das alterações estruturais ocorridas na membrana plasmática, algumas proteínas são translocadas de uma região para outra da membrana plasmática, podendo até perder a sua função (DE LEEUW *et al.*, 1990), levando a uma desestabilização da membrana e, conseqüentemente, a perda da sua função de permeabilidade seletiva. Em seguida, acontece um aumento no influxo de íons, tais como o cálcio e o bicarbonato (BAILEY *et al.*, 2008), que levam a célula a sofrer capacitação espermática (CASAS e FLORES, 2013).

Outro dano a nível molecular, comumente encontrado no processo de congelação-descongelação, é a fragmentação de DNA, mas os mecanismos que ocasionam esse fenômeno ainda são desconhecidos. Alguns estudos relacionam essa maior incidência de fragmentação de DNA com o aumento do estresse oxidativo, ao qual o espermatozoide é submetido durante a criopreservação (PAOLI *et al.*, 2014), ou seja, esses danos estariam associados à produção de radicais livres e à peroxidação lipídica, que ocorre durante a criopreservação (KASIMANICKAM *et al.*, 2007). No entanto, ainda não se tem conhecimento a respeito de como a criopreservação afetaria a integridade da cromatina.

Outra consequência da criopreservação é a redução da atividade mitocondrial, que ocorre principalmente em suínos e equinos, visto que essas são as espécies que mais apresentam sêmen de baixa congelabilidade (PEÑA *et al.*, 2015). Tal característica se deve ao fato de que essas espécies apresentam espermatozoides bastante sensíveis ao choque térmico e, acredita-se, que isso ocorre devido à menor quantidade de colesterol presente na membrana plasmática das células espermáticas (DE LEEUW *et al.*, 1990). Quanto à redução da atividade mitocondrial, essa está relacionada com a produção de espécies reativas de oxigênio (GÓMEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2013).

Todos esses danos, que o processo de criopreservação pode causar no espermatozoide, podem justificar o fato do sêmen congelado de suíno apresentar, após descongelação, resultados insatisfatórios, em que apenas 20 a 30% dos espermatozoides permanecem viáveis (SALAMON e MAXWELL, 2000).

Proteínas do sêmen suíno e sua relação com a criopreservação

A criopreservação de sêmen é o método mais eficaz para armazenar espermatozoides por um longo período, entretanto, em suínos, menos de 1% das inseminações artificiais são realizadas com sêmen criopreservado (JOHNSON *et al.*, 2000; ANDRADE *et al.*, 2019). Isso ocorre porque a criopreservação de sêmen, nessa espécie, ainda apresenta resultados insatisfatórios quando comparado com o sêmen refrigerado (RATH *et al.*, 2009).

Apesar da maior sensibilidade do espermatozoide suíno ao processo, nem todos os ejaculados apresentam a mesma capacidade de resistir ao processo de congelação-descongelação, sendo observadas diferenças não só entre as diferentes raças de varrões (WATERHOUSE *et al.*, 2006), mas também entre os ejaculados do mesmo animal (ROCA *et al.*, 2006; CORCINI *et al.*, 2012) e entre as frações provenientes do mesmo ejaculado (PEÑA *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, tem-se dado muita importância aos componentes do plasma seminal, nas diferentes frações que compõem o ejaculado do varrão, e a seus efeitos sobre os espermatozoides (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2005). Acredita-se que a diferença de concentração dos componentes do plasma, presentes entre as frações, pode influenciar diretamente na capacidade do espermatozoide resistir à redução de temperatura. Nesse sentido, Peña *et al.* (2003) citam que os espermatozoides oriundos dos primeiros 10mL da porção espermática rica do ejaculado de varrões, resistem melhor aos procedimentos de diluição, resfriamento, congelação e descongelação do que aqueles contidos no restante do ejaculado fracionado (segunda porção da fração rica e fração pós-espermática).

Por essa razão, devido à diferença da composição proteica presente no sêmen, os varrões são classificados como animais que apresentam ejaculados com "boa" ou "má" congelabilidade (WATSON, 1995) e os seus ejaculados classificados respectivamente como *good freezability ejaculates* (GFE) ou *poor freezability ejaculates* (PFE) (CASAS *et al.*, 2009).

A possibilidade em classificar o animal quanto à capacidade do espermatozoide resistir ao processo de criopreservação tem sido atribuída a variações genéticas, ou seja, são as particularidades do animal quanto à composição proteica do sêmen que influenciam diretamente no resultado da criopreservação seminal (VILAGRAN *et al.*, 2014). Com isso, há um aumento na busca por marcadores de congelabilidade, através da caracterização de proteínas específicas do sêmen, que estão envolvidas na atividade espermática (COLLARES, 2005).

O plasma seminal possui proteínas que desempenham papel ativo sobre o espermatozoide, a partir do momento em que se une a células durante a ejaculação, propiciando o desenvolvimento da célula e a maturação espermática. Além disso, desempenha papel importante no transporte e na sobrevivência do espermatozoide no trato reprodutivo da fêmea, pois impede que ocorra a capacitação induzida (TROEDSSON *et al.*, 2005).

Em suínos, os principais componentes proteicos pertencem à família das espermadesinas, que são glicoproteínas de baixo peso molecular, entre 12 e 16 kDa. Essas proteínas se ligam à membrana plasmática do espermatozoide e correspondem à mais de 90% das proteínas presentes no plasma seminal (CABALLERO *et al.*, 2008). As espermadesinas, em suínos, são compostas por cinco proteínas (PSP-I, PSP-II, AQN-1, AQN-3 e AWN), que

são sintetizadas principalmente pelas glândulas vesiculares, pelo epidídimo e pela *rete testis* (CALVETE *et al.*, 1993).

A variação da sequência, a glicosilação e o estado de agregação das espermedesinas contribuem para suas distintas atividades biológicas (CALVETE *et al.*, 1995). A AQN-1, a AQN-3 e a AWN são moléculas que apresentam afinidade com a heparina e parecem estar envolvidas nos eventos que ocorrem na fertilização e que são mediados por carboidratos (EKHLASI-HUNDRIESER *et al.*, 2005). Já as aquaporinas AQP3 e AQP7 (PRIETO-MARTINEZ *et al.*, 2017) e a proteína NPC2 ou *Niemann-Pick disease type C2 protein* (VALENCIA *et al.*, 2017) foram identificadas em maiores níveis no sêmen de alta congelabilidade. Segundo Rodrigues-Martinez *et al.* (1998), a proteína AWN permanece aderida à membrana acrossomal após o transporte pelo órgão genital feminino, durante a capacitação espermática, e acredita-se que possa estar envolvida no reconhecimento de gametas.

Já o heterodímero PSP-I/PSP-II é uma proteína que não apresenta afinidade com a heparina, e parece preservar, *in vitro*, a integridade da membrana plasmática, a motilidade espermática e a atividade mitocondrial dos espermatozoides, enquanto são expostos a essa proteína incluída no meio diluente (CENTURIÓN *et al.*, 2003; GARCIA *et al.*, 2006). Esse efeito protetor parece estar relacionado à adesão do heterodímero ao acrossoma do espermatozoide, sugerindo um efeito estabilizador sobre a fluidez da membrana plasmática e, talvez, um papel de capacitação sobre as células espermáticas (DU *et al.*, 2016). Além disso, o heterodímero PSP-I/PSP-II pode ser utilizado como biomarcador de fertilidade e tamanho de leitegada (KANG *et al.*, 2019).

O uso do heterodímero PSP-I/PSP-II isolado tem a vantagem de evitar a variabilidade do plasma seminal entre machos ou ejaculados de um mesmo macho, (ROZEBOOM *et al.*, 2000) podendo então possibilitar uma melhora significativa na criopreservação de sêmen suíno.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há evidências de que componentes moleculares, como as proteínas presentes no plasma seminal, modulam a função espermática, o que indica que elas são potenciais marcadores moleculares da possibilidade de criopreservação do sêmen suíno, com preservação da sua capacidade de fertilização. Tais estudos são importantes para entender o papel desses componentes do plasma e sua relação quanto à modificação da estrutura da membrana plasmática, que ocorre durante a criopreservação. O heterodímero PSP-I/PSP-II apresentou efeito protetor nas células espermáticas durante o período de criopreservação, sendo assim, a adição dessa proteína ao diluente de congelamento pode trazer resultados benéficos para o sêmen suíno e atuar como um possível marcador de congelabilidade.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.; WILSON, J.; HUNT, T. Organização interna da célula: Estrutura da

membrana. In: _____. *Biologia Molecular da Célula*. 4ª ed., Porto Alegre: Artmed. Cap. 10, p.583-595, 2004.

ALMEIDA, J.L. Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen equino. 2006. 75p. (Dissertação). Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília; 2006.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoa function. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. (Ed.) *Equine Reproduction*. 2ª ed., Philadelphia: Lea & Febiger, p.715-745, 1993.

ANDRADE, A.F.C.; PEDROSA, A.C.; PASSARELLI, M.S.; MARTINS, S.M.M.K. Protocolos e possibilidades de criopreservação de sêmen suíno. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.43, n.2, p.89-96, 2019.

AZEVEDO, H.C.; MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A.A.; SOARES, A.T. Características do sêmen caprino congelado: influência do tipo de palheta e concentração espermática. *Revista Ciência Rural*, v.5, n.2, p.148-157, 2000.

BAILEY, J.L.; LESSARD, C.; JACQUES, J.; BRÈQUE, C.; DOBRINSKI, I.; ZENG, W.; GALANTINO-HOMER, H.L. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology*, v.70, p.1251–1259, 2008.

BOERKE, A.; DIELEMAN, S.J.; GADELLA, B.M.A. Possible role for sperm RNA in early embryo development. *Theriogenology*, v.68, n.1, p.147–155, 2007.

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

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

CABALLERO, I.; VAZQUEZ, J.M.; GARCÍA, E.M.; PARRILLA, I.; ROCA, J.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; MARTÍNEZ, E.A. Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa. *Theriogenology*, v.70, n.8, p.1352–1355, 2008.

CALVETE, J.J.; REINERT, M.; SANZ, L.; TÖPFER-PETERSEN, E. Effect of glycosylation on the heparin-binding capability of boar and stallion seminal plasma proteins. *Journal of Chromatography*, v.711, n.1, p.167–173, 1995.

CALVETE, J.J.; SOLIS, D.; SANZ, L.; DIAZ-MURILLO, T.; SCHAFER, W.; MANN, K.; TÖPFER-PETERSEN, E. Characterization of two glycosylated boar spermadhesins. *European Journal of Biochemistry*, v.218, p.719-725, 1993.

CASAS, I.; FLORES, E. Gene banking: the freezing strategy. In: BONET, S.; CASAS, I.; HOLT, W.V.; YESTE, M. Editors. *Boar Reproduction*. Berlin: Springer, p.551–88, 2013.

CASAS, I.; SANCHO, S.; BRIZ, M.; PINART, E.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M. Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins. *Theriogenology*, v.72, n.7, p.930–948, 2009.

CENTURIÓN, F.; VÁZQUEZ, J. M.; CALVETE, J. J.; ROCA, J.; SANZ, L.; PARRILLA, I.; GARCÍA, E. M.; MARTÍNEZ, E.A. Influence of porcine spermadhesins on the susceptibility of boar spermatozoa to high dilution. *Biology of Reproduction*, v.69, n.3, p.640–646, 2003.

CHUAYCHU-NOO, N.; THANANURAK, P.; CHANKITISAKUL, V.; VONGPRALU, T. Supplementing rooster sperm with Cholesterol-Loaded-Cyclodextrin improves fertility after cryopreservation. *Cryobiology*, v.74, p.8-12, 2017.

COLLARES, T.; BONGALHARDO, D.C.; DESCHAMPS, J.C.; MOREIRA, H.L.M. Transgenic animals: The melding of molecular biology and animal reproduction. *Animal Reproduction*, v.2, n.1, p.11-27, 2005.

CORCINI, C.D.; VARELA, A.S.; PIGOZZO, R.; RAMBO, G.; GOULARTE, K.L.; CALDERAM, K.; LEON, P.M.M.; BONGALHARDO, D.C.; LUCIA JR., T. Pre-freezing and post-thawing quality of boar sperm for distinct portions of the ejaculate and as a function of protein bands presente in seminal plasma. *Livestock Science*, v.145, n.1, p.28-33, 2012.

DE LEEUW, F.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. *Reproduction in Domestic Animals*, v.1, n.1, p.95–104, 1990.

DE JONGE, C.; BARRATT, C.L. Gamete donation: a question of anonymity. *Fertility and Sterility*, v.85, n.2, p.500-501, 2006.

DU, J.; SHEN, J.; WANG, Y.; PAN, C.; PANG, W.; DIAO, H.; DONG, W. Boar seminal plasma exosomes maintain sperm function by infiltrating into the sperm membrane. *Oncotarget*, v.7, n.37, p.58832–58847, 2016.

EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. *The Physiology of Reproduction*. 2^a ed., New York: Raven Press. Cap. 2, p.29-77, 1994.

EKHALASI-HUNDRIESER, M.; SCHAFER, B.; KIRCHHOFF, C.; HESS, O.; BELLAIR, S.; MÜLLER, P.; TÖPFER- PETERSEN, E. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. *Molecular Reproduction Development*, v.70, n.1, p.45–57, 2005.

EVANS, G., MAXWELL, W.M C. *Salamon inseminación artificial de ovejas y cabras*. 1^a ed., Zaragoza: Acribia, 1990. 191p.

FLESCH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1469, n.3, p.197-235, 2000.

FOXCROFT, G.R.; DYCK, M.K.; RUIZ-SANCHEZ, A.; NOVAK, S.; DIXON, W.T. Identifying useable semen. *Theriogenology*, v.70, n.8, p.1324–36,2008.

GADELLA, B.M.; COLENBRANDER, B. Bicarbonate dependent capacitation of mammalian sperm cells: a comparative overview. In: *Proceedings of a workshop on transporting gametes and embryos*, 12, Brewster – Massachusetts, p.43-48, 2003.

GAO, D.; CRITSER, J.K. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR Journal*, v.41, n.4, p.187–196, 2000.

GARCIA, E.M.; VÁZQUEZ, J.M.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; CABALLERO, I.; PARRILLA, I.; GIL, M.A.; ROCA, J.; MARTINEZ, E.A. Dissecting the protective effect of the seminal plasma spermadhesin PSP-I/PSP-II on boar sperm functionality. *Journal of Andrology*, v.27, n.3, p.434-443, 2006.

GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J.; GÓMEZ-IZQUIERDO, E.; TOMÁS, C.; MOCÉ, E.; DE MERCADO, E. Is sperm freezability related to the post-thaw lipid peroxidation and the formation of reactive oxygen species in boars? *Reproduction in Domestic Animals*, v.48, n.2m p.177–82, 2013.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v.12, n.1, p.131-147, 1996.

GUIMARÃES, D.B.; BARROS, T.B.; VAN TILBURG, M.F.; MARTINS, J.A.M.; MOURA, A.A.; MORENO, F.B.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.; MOREIRA, R.A.; TONIOLLI, R. Sperm membrane proteins associated with the boar semen cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, v.183, p.27-38, 2017.

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

HAFEZ, E.S.E. Preservação e criopreservação de gametas e embriões. In: __. *Reprodução Animal*. 6ª ed., Manole: São Paulo. Cap. 24, p.513-535, 1995.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm; what we ask them to survive. *Journal of Andrology*, v.11, n.1, p.73-88, 1990.

HOLT, W.V.; MEDRANO, A.; THURSTON, L.M.; WATSON, P.F. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology*, v.63, n.2, p.370–382, 2005.

HOLT, W.V.; NORTH, R.D. Determination of liquid components and thermal phase transition temperature in an enriched plasma membrane fraction from spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.73, p.285-294, 1985.

JAISWAL, B.S.; CONTI, M. Identification and functional analysis of splice variants of the germ cell soluble adenylyl cyclase. *Journal of Biology and Chemistry*, v.276, n.35, p.31.698–31.708, 2001.

JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; MAXWELL, W.M. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*, v.62, n.1-3, p.143-172, 2000.

KANG, S.; PANG, W-K.; RYU, D.-Y.; SONG, W.-H.; RAHMAN, M.S.; PARK, Y.-J.; PANG, M.-G. Porcine seminal protein-I and II mRNA expression in boar spermatozoa is significantly correlated with fertility. *Theriogenology*, v.138, n.1, p.31-38, 2019.

KASIMANICKAM, R.; KASIMANICKAM, V.; THATCHER, C.D.; NEBEL, R.L.; CASSELL B.G. Relationships among lipid peroxidation, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, sperm parameters, and competitive index in dairy bulls. *Theriogenology*, v.67, n.7, p.1004–1012, 2007.

KOPEIKA, J.; THORNHILL, A.; KHALAF, Y. The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Human Reproduction Update*, v.30, n.1, p.209–227, 2015.

KOTHARI, S.; THOMPSON, A.; AGARWAL, A.; DU PLESSIS, S.S. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian Journal of Experimental Biology*, v.48, p.425-435, 2010.

LEE, Y.S.; LEE, S.; LEE, S.H.; YANG, B.K.; PARK, C.K. Effect of cholesterol-loaded-cyclodextrin on sperm viability and acrosome reaction in boar semen cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, v.159, p.124-130, 2015.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. *Lehninger: Princípios de Bioquímica*. 4ª ed. São Paulo: Editora Sarvier, 2005. 1120p.

LI, J.; ROCA, J.; PÉREZ-PATIÑO, C.; BARRANCO, I.; MARTINEZ, E.A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; PARRILLA, I. Is boar sperm freezability more intrinsically linked to spermatozoa than to the surrounding seminal plasma? *Animal Reproduction Science*, v.195, p.30-37, 2018.

LONE, S.A. Possible mechanisms of cholesterol-loaded cyclodextrin action on sperm during cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, v.192, p.1-5, 2018.

MACK, S.R.; EVERINGHAM, J.; ZANEVELD, L.J.D. Isolation and partial characterization of the plasma membrane from human spermatozoa. *Journal of Experimental Zoology*, v.240, n.1, p.125-136, 1986.

MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, v.57, n.1, p.327-344, 2002.

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

MOCÉ, E.; GRAHAM, J.K. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. *Journal of Animal Science*, v.84, n.5, p.826–833, 2006.

MOURA, A.A.; CHAPMAN, D.A.; KOC, H.; KILLIAN, G.J. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. *Animal Reproduction Science*, v.98, n.3-4, p.169-188, 2007.

MORAN, D.M.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L.; AMANN, R.P. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.38, p.999-1012, 1992.

MUKAI, C.; OKUNO, M. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biology of Reproduction*, v.71, p.540–547, 2004.

NEILL, D.J. *Physiology of Reproduction*. 3ª ed., vol. 1, 2006. 3296p.

NESCI, S.; SPINACI, M.; GALEATI, G.; NEROZZI, C.; PAGLIARANI, A.; ALGIERI, C.; TAMANINI, C.; BUCCI, D. Sperm function and mitochondrial activity: An insight on boar sperm metabolism. *Theriogenology*, v.144, p.82-88, 2020.

NOVAK, S.; RUIZ-SÁNCHEZ, A.; DIXON, W.T.; FOXCROFT, G.R.; DYCK, M.K. Seminal Plasma Proteins as Potential Markers of Relative Fertility in Boars. *Journal of Andrology*, v.31, n.2, p.188–200, 2010.

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

PAOLI, D.; LOMBARDO, F.; LENZI, A.; GANDINI, L. Sperm cryopreservation: effects on chromatin structure. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v.791, p.137–150, 2014.

PEÑA, F.J.; DAVILA, M. P.; BALL, B.A.; SQUIRES, E.L.; MARTIN MUÑOZ, P, FERRUSOLA, C.O.; SILVA, C.B. The impact of reproductive technologies on stallion mitochondrial function. *Reproduction in Domestic Animals*, v.50, p.529–37, 2015.

PEÑA, F.J.; SARAVIA, F.; NÚÑEZ-MARTÍNEZ, I.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, H. Different portions of the boar ejaculate vary in their ability to sustain cryopreservation? *Animal Reproduction Science*, v.93, p.101–113, 2006.

PEÑA, F.J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Animal Reproduction Science*, v.78, n.1-2, p.85-98, 2003.

PRIETO-MARTÍNEZ, N.; VILAGRAN, I.; MORATÓ, R.; ÁLAMO, M.M.R.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; BONET, S.; YESTE, .M. Relationship of aquaporins 3 (AQP3), 7 (AQP7), and 11 (AQP11) with boar sperm resilience to withstand freeze–thawing procedures. *Andrology*, v.5, n.6, p.1153-1164, 2017.

RATH, D.; BATHGATE, R.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; ROCA, J.; STRZEZEK, J.; WABERSKI, D. Recent advances in boar semen cryopreservation *Society of Reproduction and Fertility*, v.66, Suppl. 1, p.51–66, 2009.

RECUERO, S.; FERNANDEZ-FUERTES, B.; BONET, S.; BARRANCO, I.; YESTE, M. Potential of seminal plasma to improve the fertility of frozen-thawed boar spermatozoa. *Theriogenology*, v.137, p.36-42, 2019.

ROCA, J.; HERNANDEZ, M.; CARVAJAL, G.; VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A. Factors influencing boar sperm cryosurvival. *Journal of Animal Science*, v.84, n.10, p.2692–2699, 2006.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; TIENHAI, P.; JOHANNISSON, A.; VÁZQUEZ, J.M.; MARTÍNEZ, E.; ROCA, J.; SANZ, L.; CALVETE, J.J. Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology*, v.63, p.514-535, 2005.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; IBORRA, A.; MARTINEZ, P.; CALVETE, J.J. Immunoelectron microscopic imaging of spermadhesin AWN epitopes on boar spermatozoa

bound in vivo to the zona pellucida. *Reproduction Fertility Development*, v.10, p.491–497, 1998.

ROZEBOOM, K.J.; TROEDSSON, M.H.T.; HODSON, H.H.; SHURSON, G.C.; CRABO, B.G. The importance of seminal plasma on the fertility of subsequent artificial insemination in swine. *Journal of Animal Science*, v.78, n.2, p.443–448, 2000.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v.62, n.1-3, p.77-111, 2000.

SALMON, V.M.; CASTONGUAY, F.; DEMERS-CARON, V.; LECLERC P.; BAILEY, J.L. Cholesterol-loaded cyclodextrin improves ram sperm cryoresistance in skim milk-extender. *Animal Reproduction Science*, v.177, n.1, p.1-11, 2017.

SILVA, E.F.; CARDOSO, T.F.; TAVARES, G.C.; COSTA, V.G.G.; SILVA, J.F.; VARELA, A.S.JR.; LEITE, F.P.L.; CORCINI, C.D. Criopreservação de sêmen suíno e a pesquisa com antioxidantes. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.108, p.103-112, 2013.

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

STRZEZEK, J. Secretory Activity of Boar Seminal Vesicle Glands. *Reproductive Biology*, v.2, n.3, p.243–66, 2002.

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

TONIOLLI, R.; GUIMARÃES, D.B.; BARROS, T.B. Proteínas do sêmen e sua relação com a resistência à congelação em ejaculados de diferentes varrões. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.41, n.1, p.297-311, 2017.

TROEDSSON, M.H.; DESVOUSGES, A.; ALGHAMDI, A.S.; DAHMS, B.; DOW, C.A.; HAYNA, J.; VALESCO, R.; COLLAHAN, P.T.; MACPHERSON, M.L.; POZOR, M.; BUHI, W.C. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Animal Reproduction Science*, v.89, n.1-4, p.171–86, 2005.

TURNER, R.M. Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? *Journal of Andrology*, v.24, n.6, p.790-802, 2003.

VADNAIS, M.L.; ALTHOUSE, G.C. Characterization of capacitation, cryoinjury, and the role of seminal plasma in porcine sperm. *Theriogenology*, v.76, p.1508–16, 2011.

VALENCIA, J.; GÓMEZ, G.; LÓPEZ, W.; MESA, H.; HENAO, F.J. Relationship between HSP90a, NPC2 and L-PGDS proteins to boar semen freezability. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v.8, p.1-10, article 21, 2017.

VILAGRAN, I.; YESTE, M.; SANCHO, S.; CASAS, I.; RIVERA DEL ALAMO, M.M.; BONET, S. Relationship of sperm small heat-shock protein 10 (ODF1/HSPB10) and voltage-

dependent anion channel 2 (VDAC2) with semen freezability in boars. *Theriogenology*, v.82, p.418–426, 2014.

WATERHOUSE, K.E.; HOFMO, P.O.; TVERDAL, A.; MILLER JR, R.R. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction*, v.131, n.5, p.887–894, 2006.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development*, v.7, n.4, p.871–891, 1995.

YESTE, M. State-of-the-art of boar sperm preservation in liquid and frozen state. *Animal Reproduction*, v.14, n.1, p.69-81, 2017.