

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

Adenosina Trifosfato (ATP) na criopreservação de sêmen suíno

Lúcia Pereira Dias

Pelotas, 2017

Lúcia Pereira Dias

Adenosina Trifosfato (ATP) na criopreservação de sêmen suíno

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Carine Dahl Corcini

Coorientador: Antonio Sergio Varela Junior

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

D541a Dias, Lúcia Pereira

Adenosina Trifosfato (ATP) na criopreservação de
sêmen suíno. / Lúcia Pereira Dias ; Carine Dahl Corcini,
orientadora ; Antonio Sérgio Varela Junior, coorientador. —
Pelotas, 2017.

43 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação
em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade
Federal de Pelotas, 2017.

1. Espermatozoide. 2. Energia. 3. Congelamento. 4.
Motilidade. I. Corcini, Carine Dahl, orient. II. Varela Junior,
Antonio Sérgio, coorient. III. Título.

CDD : 636.0898

Lúcia Pereira Dias

Adenosina Trifosfato (ATP) na criopreservação de sêmen suíno

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 10/02/2017

Banca examinadora:

Prof. Dr. Carine Dahl Corcini (Orientador)
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)

Prof. Dr. Antonio Sergio Varela Junior (Coorientador)
Doutor em Aquicultura, pela Universidade Federal de Rio Grande (FURG)

Prof. Dra. Jorgea Pradieé
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)

Prof. Dr. João Carlos Deschamps
Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade de Illinois em Urbana-Champaign (UIUC/EUA)

Prof. Dra. Fabiana Moreira
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)

**Dedico aos meus pais
Vilma e Tácito**

Agradecimentos

Aos meus pais, Tácito Gaspar Dias e Vilma Pereira Dias. Ao meu marido Guilherme, minha irmã Cleonice, meus sobrinhos Augusto e Gustavo e minha tia Gilda, e demais familiares, por participarem junto em todas as etapas de meu crescimento pessoal e profissional.

A minha Orientadora Dra. Carine Dahl Corcini e juntamente com seu marido prof. Dr. Antônio Sérgio Varela Jr. pelas oportunidades proporcionadas, conhecimentos adquiridos e convivência.

As minhas colegas-parceiras Sara Lorandi e Andréia Anciuti, pela amizade, ajuda e convivência no laboratório, além de todos os momentos que passamos juntas para que este estudo fosse concretizado.

Aos demais colegas do Laboratório Repropel, em especial Karina, Edenara, Marina e Camila. Ao seu Paulo, pela companhia e disposição em ajudar.

Aos professores Arnaldo, Bernardo e Thomaz, pela contribuição na execução dos trabalhos. Ao grupo ReproPel, pela oportunidade e conhecimentos adquiridos.

Agradeço também a Bretanha Importação e Exportação Ltda - Central de IA de São Carlos/SC, local onde foi executado parte do projeto. Ao IFSul, por ter concedido um tempo de afastamento para aperfeiçoamento nas atividades de docência. A Faculdade de Veterinária/UFPEL, por apresentar programa de Pós-graduação, oportunizando inovação e qualificação de conhecimentos através da pesquisa.

E sempre a Deus, pela vida e família, permitindo que eu siga minha caminhada.

Obrigada!

“Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo e pensar uma coisa diferente.”
Roger Von Oech

Resumo

DIAS, Lúcia Pereira. **Adenosina Trifosfato (ATP) na criopreservação de sêmen suíno**. 2017. 43f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

O espermatozoide suíno é uma célula metabolicamente ativa, que necessita de aporte energético, na forma de adenosina trifosfato (ATP), para manter sua homeostase. A partir da hidrólise do ATP em adenosina monofosfato, é sinalizada a atividade motora para o movimento flagelar. Contudo, quando o espermatozoide da espécie suína é submetido a processos tecnológicos de conservação de sêmen, como a criopreservação, há gastos energéticos acima do normalmente esperado, com perdas na concentração de células viáveis, promovendo baixa motilidade espermática diminuindo sua qualidade seminal. Estruturas celulares como, membrana plasmática, mitocôndria e acrossoma podem ser afetadas negativamente pelas crioinjúrias que sofrem as células devido aos processos de congelamento/descongelamento da criopreservação. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da adição de ATP exógeno, em diferentes concentrações, no diluente de congelamento de sêmen suíno, através da análise de cinética e estruturas celulares. O estudo foi realizado a partir de 23 amostras de doses inseminantes de ejaculados suíno ($n=23$), provenientes de uma central de inseminação. Na metodologia da criopreservação foram utilizados diluentes de resfriamento, Lactose-11% (80%) e gema de ovo (20%), e de congelamento com 89,5% do DR + 1,5% Equex-Paste® e 9% de Glicerol. No diluente de congelamento foi adicionado o ATP exógeno (Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate - Sigma-Aldrich®) nas concentrações T1 (C), T2 (0,025mM), T3 (0,25mM), T4 (2,5mM) e T5 (25,0 mM). As palhetas obtiveram um volume total de 0,5mL em cada com concentração de 500×10^6 espermatozoides. Foram descongeladas em banho-maria (37°C) e realizada a leitura da cinética no sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis Sperm Vision 3.5) em três tempos, e as estruturas celulares pelo Citometro de fluxo (Attune® Cytometer). Os resultados apresentaram-se variados, porém, ficou evidenciado que o tratamento com 0,25mM de ATP foi o mais satisfatório no descongelamento (tempo zero) para a cinética espermática (motilidade total e progressiva), enquanto que o tratamento com 25mM foi o que apresentou menor desempenho, porém este, obteve um resultado melhor nos tempos de uma e 2 horas após o descongelamento.

Palavras chaves: espermatozóide; energia; congelamento; motilidade

Abstract

DIAS, Lúcia Pereira. **Adenosine triphosphate (ATP) in the cryopreservation of swine semen**. 2017. 43f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Pig spermatozoa is a metabolically active cell, which requires energy input, in the form of adenosine triphosphate (ATP), to maintain its homeostasis. From the hydrolysis of ATP in adenosine monophosphate, motor activity is signaled for flagellar movement. However, when the spermatozoa of the swine species are subjected to technological processes of semen conservation, such as cryopreservation, there are energy expenditures above the normally expected, with losses in the concentration of viable cells, promoting low sperm motility reducing their seminal quality. Cellular structures such as plasma membrane, mitochondria, and acrosome may be negatively affected by the cryoinjuries that undergo the cells due to the freeze / thaw processes of cryopreservation. The objective of this study was to evaluate the effects of the addition of exogenous ATP, in different concentrations, in the swine semen freezing diluent, through kinetic analysis and cellular structures. In the cryopreservation methodology, diluents of cooling, Lactose-11% (80%) and egg yolk were used. The study was performed from 23 samples of inseminating doses of porcine ejaculates (n = 23) from an insemination center. (20%) and freezing with 89.5% of DR + 1.5% Equex-Paste® and 9% Glycerol. In the freezing diluent, exogenous ATP (Adenosine 5'-triphosphate disodiumsalhydrate - Sigma-Aldrich (0.25 mM), T4 (2.5 mM) and T5 (25.0 mM). The vials obtained a total volume of 0.5 mL each Concentration of 500x10⁶ spermatozoa, were thawed in a water bath (37 ° C) and the kinetics were read in the three-phase Computer Assisted Sperm Analysis (SpermVision 3.5) system and the cell structures by the Flow Cytometer (Attune® Cytometer) The results were varied, however, it was evidenced that the treatment with 0.25 mM of ATP was the most satisfactory (Total time and progressive motility), while the treatment with 25mM was the one that presented the lowest performance, but this one, obtained a better result in the times of one and two hours after the thawing.

Keywords: sperm; energy; freezing; motility

Lista de Tabelas

Tabela 1	Motilidade total e progressiva em três tempos nos diferentes tratamentos com ATP.....	27
Tabela 2	Valores de velocidade curvilínea (VCL), velocidade média (VAP) e velocidade progressiva (VSL) nos três tempos e cinco concentrações de ATP.....	29
Tabela 3	Distâncias percorridas pela célula espermática nos diferentes tratamentos com ATP em três.....	30
Tabela 4	Valores médios para amplitude do deslocamento lateral (ALH μ m) da cabeça e frequência de batimento flagelar (BCF μ m).....	31
Tabela 5	Retilinearidade e Linearidade das células espermáticas nos três tempos (0h, 1h e 2h).....	31
Tabela 6	Análises de citometria de fluxo de espermatozoides descongelados com diluentes em diferentes concentrações de ATP.....	32

Lista de Abreviaturas

ALH	Deslocamento lateral da cabeça
ATP	Adenosida trifosfato
BCF	Frequência de batimento flagelar
BSA	Albumina sérica bovina
BTS	Beltsville Thawing Solution
DAP	Distância média percorrida
DCL	Distância curvilínea
DI	Dose inseminante
DC	Diluyente de congelamento
DR	Diluyente de resfriamento
DSL	Distância retilínea
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
IA	Inseminação Artificial
LIN	Linearidade
MT	Motilidade Total
MP	Motilidade Progressiva
N ₂ L	Nitrogênio Líquido
SPTZ	Espermatozoide
VCL	Velocidade curvilínea
VAP	Velocidade média do percurso
VSL	Velocidade linear progressiva
STR	Retilinearidade

Lista de Símbolos

°C	Grau Celsius
®	Marca registrada
mL	Mililitro
µL	Microlitro
mg	Miligramma
µg	Microgramma
mM	Milimolar
µM	Micromolar
nM	Nanomolar

Sumário

1 Introdução.....	13
2 Revisão Bibliográfica.....	14
2.1 Metabolismo energético do espermatozóide.....	14
2.1.1 Adenosina trifosfato (ATP).....	14
2.2 Criopreservação do sêmen suíno	16
2.2.1 Crioprotetores.....	17
2.2.2 Criopreservação e funcionalidade celular.....	17
2.2.3 Níveis de ATP após descongelamento.....	18
3 Objetivos.....	20
3.1 Objetivo Geral.....	20
3.2 Objetivos Específicos.....	20
4 Materiais e Métodos.....	21
4.1 Animais.....	21
4.2 Coleta do sêmen.....	21
4.3 Diluição do sêmen fresco.....	21
4.4 Curva de resfriamento.....	22
4.5 Diluente de resfriamento.....	22
4.6 Diluente de congelamento.....	22
4.7 Congelamento.....	23
4.8 Descongelamento.....	23
4.9 Análises da cinética espermática.....	24

4.10 Análises das estruturas celulares.....	24
4.11 Análise estatística.....	26
5 Resultados e discussão.....	27
6 Considerações Finais.....	35
Referências.....	36

1 Introdução

O espermatozoide é uma célula metabolicamente ativa, que necessita de grandes quantidades de energia, na forma de adenosina trifosfato (ATP), para manter a sua funcionalidade. Eventos como a motilidade, capacitação, reação acrossômica e, até mesmo, a própria homeostase são dependentes de energia (FORD, 2006). A célula espermática apresenta regiões especializadas na produção de energia, como a região mitocondrial, na peça intermediária, através da fosforilação oxidativa e pela glicólise, na região citoplasmática ao longo do flagelo, conhecida como peça principal (TURNER, 2003, MIKI et al., 2004). A partir da hidrólise do ATP em adenosina monofosfato, é sinalizada a atividade motora das proteínas axonemais, localizadas no flagelo, para o movimento flagelar (COSSON, 2012).

A criopreservação, que é um processo tecnológico de conservação de sêmen, promove gastos de energia, diminuindo a concentração de células espermáticas viáveis com movimentos progressivos – motilidade, além de afetar as vias metabólicas relacionadas à produção de ATP, resultando na incapacidade de uma parte da população de espermatozoides em fecundar o óócito (WATSON et al., 2000 et al; ARAMLI et al., 2013).

Adenosina trifosfato é uma molécula que não atravessa facilmente a membrana plasmática, porém, algumas propostas são atribuídas, como a de incorporação do ATP exógeno, durante o período de re-organização estrutural da membrana no descongelamento, realizado pela criopreservação do sêmen suíno (BURNSTOCK, 2006).

Este estudo analisou a motilidade espermática e parâmetros estruturais da célula do sêmen suíno criopreservado com adição de ATP exógeno, a fim de verificar a sua viabilidade no pós descongelamento.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Metabolismo energético do espermatozoide

O espermatozoide maduro é uma célula altamente definida e compartimentada, apresentando regiões especializadas. Na cabeça encontra-se o núcleo com o DNA, e a vesícula acrossomal, que é responsável pela interação com o gameta feminino (RAMALHO-SANTOS et al., 2009; TURNER, 2003). Do ponto de união da cabeça com o flagelo ou cauda, encontra-se a peça intermediária, que está envolvida com a produção de energia, por acomodar as cristas mitocondriais (COSSON, 2012). Ainda no flagelo, tem-se a peça principal com os filamentos de axonema, recobertos por uma bainha fibrosa que fornece suporte no controle e movimento flagelar, envolvido com a motilidade celular (KRISFALUSI, 2006; TURNER, 2003; MORTIMER, 1997). Os axonemas do flagelo apresentam braços internos e externos formados essencialmente de dineína/ATPases, que conferem a habilidade da transformação de energia química, produzida na mitocôndria, em trabalho mecânico, ou seja, o movimento do espermatozoide (KIM et al., 2007). Para tanto, a célula espermática necessita de um aporte energético através de adenosina trifosfato (TURNER, 2003).

2.1.1 Adenosina trifosfato (ATP)

Adenosina trifosfato (ATP) é a molécula que desdobra energia para todas as células. Estruturalmente é constituída de três grupos fosfato e uma adenosina composta de adenina (nucleotídeo) e ribose (pentose). Em todos os tipos de células, as concentrações de ATP são reguladas por um equilíbrio dinâmico entre dois processos primários: glicólise e fosforilação oxidativa (TAKEI et al., 2014), sendo a fosforilação oxidativa, o maior gerador de ATP, através da cadeia de transporte de elétrons (ST JOHN et al., 2005; NELSON & COX, 2004).

A cadeia respiratória ou de transporte de elétrons ocorre na mitocôndria das células eucarióticas, que no caso da célula espermática, localiza-se na peça intermediária. Este segmento é responsável por aproximadamente 90% da produção de energia da célula (COPELAND, 2002; CÂMARA & GUERRA, 2008), e a sua funcionalidade e integridade é fundamental para manter a homeostase do espermatozoide (ST JOHN et al., 2005).

As mitocôndrias dirigem a energia liberada da oxidação do hidrogênio para bombear os prótons através da membrana interna da ATP sintase. Este processo depende do fornecimento estável de oxigênio e hidrogênio, a partir de substratos presentes no sêmen (COSSON, 2012), transformando a molécula de ATP em ADP (adenosina difosfato) mais um fosfato livre.

Embora a fosforilação oxidativa seja a via metabólica mais rentável, existem dúvidas relacionadas à difusão do ATP até a peça principal (TURNER, 2003; NELSON & COX, 2004). Dessa forma, alguns autores acreditam que a distância é muito longa para o ATP originado da peça intermediária difundir-se em tempo hábil, e supõe-se que a glicólise produzida no citoplasma, na peça principal, onde estão presentes enzimas glicolíticas, como: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, hexoquinase-1 e fosfofrutoquinase-M, associadas à bainha fibrosa (KRISFALUSI et al., 2006; KIM et al., 2007), tem papel importante na transferência de energia das porções finais do flagelo (TAKEI et al., 2014; TURNER, 2003, MIKI et al., 2004, CAO et al., 2006).

A célula espermática é capaz de captar várias fontes de energia no plasma seminal, sendo a glicose o monossacarídeo mais rapidamente consumido por meio da glicólise. Além disso, produz maior quantidade de energia, quando comparado a outros açúcares (MEDRANO et al., 2004).

Contudo Albarracin et al. (2004) e Ramió-Iluch et al. (2013), dizem que a energia obtida do ciclo de krebs, também na mitocôndria, mesmo sendo pequena, é necessária para manter a motilidade e a capacitação espermática na espécie suína. Há, ainda, relatos de estoques de glicogênio no espermatozoide, assim como a capacidade deles em realizar a gliconeogênese (FORD, 2006), uma vez que evidências recentes demonstraram que o espermatozoide do cão, suíno, carneiro e garanhão contêm reservas de glicogênio, associadas às atividades da glicogêniosintetase e glicogênio fosforilase (PALOMO et al., 2003).

A motilidade espermática ocorre em razão da atividade motora das proteínas axonemais (dineínas), localizadas na porção fibrosa da parte principal do flagelo, processo este dependente de adenosina monofosfatocíclico (AMPc). Um aumento nos níveis de bicarbonato presente no ejaculado, eleva o pH intracelular, favorecendo a atividade de dineína-ATPase (COSSON, 2012), que por sua vez, estimula a adenilciclase solúvel para a produção de AMPc. Substâncias que estimulem a adenilciclase, como o bicarbonato e o Ca^{2+} , resultam no aumento dos níveis de AMPc (GADELLA & VAN GESTEL, 2004; JAISWAL E CONTI, 2003).

A cinética espermática, os processos de capacitação e reação acrossomal, fundamentais para a fecundação, são regulados pelas vias de sinalização da adenosina monofosfato cíclica (BATTISTONE et al., 2013; DARSZON et al., 1999). O metabolismo energético espermático, de forma geral, está diretamente relacionado à concentração interna dessa substância (SIMPSON & WHITE, 1987). A presença de cálcio (Ca^{2+}) também interfere no metabolismo, em níveis fisiológicos e está associada a formas de onda e mudanças na direção do movimento espermático. Em suma, o AMPc e Ca^{2+} regulam a manutenção da motilidade do espermatozoide (COSSON, 2012).

2.2 Criopreservação do sêmen suíno

A criopreservação é a forma de preservar e armazenar células, embriões e tecidos por meio do congelamento (-196°C), diminuindo o metabolismo e mantendo em estado de quiescência por tempo indeterminado (RUBINSKY, 2003). Desta forma, quando descongelado, o material prosseguirá normalmente (PEGG, 2007). Com o sêmen, a grande vantagem dessa técnica, é manter o material genético viável por um longo período (JOHNSON et al., 2000, GERRITS et al., 2005, BAILEY et al., 2008).

No entanto, o uso do sêmen suíno criopreservado não ultrapassa 1% de todos os procedimentos de inseminação realizados nesta espécie (DIDION et al., 2013; FERNANDEZ-GAGO et al., 2013; ROMERO et al., 2004; SARAVIA et al., 2005). Vadnais et al. (2011) comenta que os espermatozoides suínos, quando comparados com outras espécies, são os que apresentam maior sensibilidade a oscilações de temperatura.

O processo de congelamento do sêmen suíno é um método demorado, desde a coleta até o envase da palheta (PURSEL & PARK, 1985). E etapas como: curvas de resfriamento, remoção do plasma seminal e uso de diluentes são importantes para minimizar o processo de crioinjúrias, danos na célula pela formação de cristais de gelo com lesões mecânicas irreversíveis nas organelas: mitocôndria e membrana plasmática (CABRITA et al., 2005).

2.2.1 Crioprotetores

Diluentes com crioprotetores são utilizados para o armazenamento do sêmen, o que ajuda a manter a viabilidade dos espermatozoides por vários dias (GADEA, 2003). Destes, existem os diluentes com crioprotetores permeáveis à membrana, que agem retirando a água da célula por diferença osmótica, facilitando o processo de desidratação celular, diminuindo sua temperatura de congelação e a formação de cristais de gelo, o glicerol e o dimetilsulfóxido (DMSO) são os mais utilizados (CAROLSFELD & HARVEY, 1999). Crioprotetores não permeáveis atuam sobre a superfície celular, reparando e estabilizando a membrana dos possíveis danos causados, a gema de ovo (colesterol), a lactose, frutose e glicose (energia), são exemplos (CAROLSFELD & HARVEY, 1999).

Estudos dos efeitos de diferentes crioprotetores, curvas e tipos de envases, têm recebido atenção especial, e as expectativas apontam para uma ampliação no uso da inseminação artificial (IA) com sêmen congelado de suínos (ANTUNES, 2007).

2.2.2 Criopreservação e funcionalidade celular

A criopreservação diminui a concentração de células espermáticas viáveis, através dos danos que podem ocorrer com a membrana plasmática. No processo inicial de resfriamento, a membrana plasmática torna-se suscetível à mudança de fases (BORGES et al., 2011; LEVIS, 2000), podendo ocorrer um aumento da permeabilidade com alterações na fluidez (KHOSRO BEYGI & ZARGHAMI, 2007; LEVIS, 2000). O colesterol é uma molécula importante da estrutura da membrana, fundamental para minimizar os efeitos da separação de fases. Espécies com sucesso na criopreservação apresentam relação colesterol/fosfolipídio maiores que

a dos suínos (0,12), como a dos bovinos (0,38) e ovinos (0,36) (DE LEEUW et al., 1990; WATSON, 1995).

Após o processo de congelamento/descongelamento, ocorre um desgaste energético dos espermatozoides, com resultado principal na motilidade, além de afetar as estruturas celulares como, potencial mitocondrial, reação acrossômica, integridade do DNA (WATSON, 2000), assim como, as vias metabólicas relacionadas à produção de ATP – adenosina trifosfato (ARAMLI et al., 2013).

A motilidade é definida como percentual de células vivas com movimentos progressivos, ou seja, movimentos ativos e para frente (BORTOLOZZO et al., 2005). Sendoela, um fator importante para o deslocamento espermático no trato reprodutivo da fêmea. E a sua avaliação é um dos principais parâmetros utilizados para selecionar ejaculados como referência. Sua qualidade está envolvida com aspectos metabólicos intracelulares, como produção de ATP e estrutura flagelar (CABRITA et al., 2010). Sendo afetada negativamente pela criopreservação, torna o sêmen de baixa fertilidade.

O uso de algumas substâncias que possam aumentar a concentração de energia, atuando na cinética espermática e mantendo a homeostase da célula, seria importante para a manutenção do sêmen criopreservado.

2.2.3 Níveis de ATP após descongelamento

Em estudos de Bosman et al. (1994), determinando concentrações de ATP em espermatozoide humanos, foi evidenciado uma diminuição significativa ($p < 0,01$) da motilidade e da concentração de ATP dos espermatozoides após congelamento/descongelamento (CALAMERA et al., 1982). Hammerstaedt (1981) evidenciou a concentração de ATP endógeno em espermatozoides bovinos, no sêmen fresco, com 76 ± 38 nmol e $10 \pm 4,7$ nmol no sêmen congelado/descongelado.

No sêmen de suínos, a concentração de ATP é cerca de 20 nmol/espermatozoides e cerca da metade deste é metabolizada a cada minuto (MANN & LUTWAK-MANN, 1981; COSSON, 2012).

Em felinos domésticos, descobriu-se que o potencial da membrana mitocondrial foi notadamente alterado após o processo de criopreservação, indicando uma suscetibilidade a crioinjúrias (THUWANUT, et al., 2010). Caso

semelhante ocorreu com outras espécies de mamíferos: garanhões (SCHOBER et al., 2007) e suínos (FLORES et al., 2010).

O ATP é uma molécula altamente carregada, portanto, não atravessa facilmente a membrana plasmática. Entretanto, existem algumas propostas de mecanismos que poderiam realizar o transporte, como a teoria da incorporação do ATP exógeno durante o período de re-organização estrutural da membrana no descongelamento espermático (BURNSTOCK, 2006). Assim, o ATP extracelular entra na célula espermática, minimiza sua depleção e aumenta a viabilidade celular (BLANCO et al., 2011).

Uma outra teoria, fala que o ATP exógeno ativa o receptor purinérgico na superfície da célula espermática, ocorrendo aumento do cálcio intracelular, provocando uma hiperativação espermática. Além disso, outros estudos indicam que o ATP exógeno ativa a sinalização do AMPc, pelo nível de cálcio mitocondrial elevado (LURIA et al., 2002).

Apesar de alguns estudos indicarem que adição de ATP exógeno aumentou a movimentação dos espermatozoides em murinos (RODRÍGUEZ-MIRANDA et al., 2008) e bovinos (LURIA et al., 2002), o efeito da suplementação de ATP exógeno na qualidade do espermatozoide dos mamíferos ainda é debatido em estudos (RODRÍGUEZ-MIRANDA et al., 2008; LURIA et al., 2002).

O processo de congelamento/descongelamento promove diferença na concentração de ATP endógeno, antes e depois da criopreservação (ARAMLI et al., 2013). Baseando-se neste fato, foi proposta a hipótese deste trabalho a inclusão de ATP exógeno no diluente de congelamento do sêmen suíno aumenta a energia disponível e qualidade das células no descongelamento.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da adição de ATP exógeno, em diferentes concentrações, na suplementação do diluente de congelamento de espermatozoides suínos provenientes de uma central de IA.

3.2 Objetivos Específicos

Analisar a forma como se comportam as células espermáticas após o descongelamento, através dos parâmetros de:

Cinética espermática em três tempos: descongelamento, uma hora e duas horas depois;

Estruturas celulares e bioquímica do espermatozoide por citometria de fluxo.

4 Materiais e Métodos

Foram utilizadas vinte e três amostras de doses inseminantes (DI) (n=23) da espécie suína, pertencentes a uma central de IA - Unidade de Disseminação de Genes (UDG), em junho de 2016.

4.1 Animais

Os doadores de sêmen (23 machos) apresentavam faixa etária variável entre 8 a 40 meses de diferentes tipos de linhagens: DBDanbred®, Agroceres® e Topigs®, e clinicamente saudáveis. Alojados em baias individuais com água *ad libitum* e alimentação controlada, com arração realizado duas vezes ao dia.

4.2 Coleta do sêmen

As coletas foram realizadas no período da manhã, pelo método da mão enluvada, descrita por Hancock & Hovell (1959), com auxílio de manequim regulável, após a realização da higiene prepucial, com papel toalha. Em cada coleta foi utilizado copo coletor graduado em 500 mL pré-aquecido a 37°C com saco plástico atóxico descartável, com papel filtro para eliminação da fração gelatinosa. Foi utilizada a fração total do plasma seminal, constituída de fração mais rica e mais diluída, em todas as amostras.

4.3 Diluição do sêmen fresco

O sêmen foi mantido em ambiente térmico (banho-maria) a 24-32°C até o seu processamento e foram avaliados padrões de qualidade seminal macroscópicos: volume, aspecto e cor; microscopicamente: motilidade, vigor e concentração, pelo sistema automação Mega Vision Bretanha®. Dos ejaculados coletados, somente aqueles que apresentaram motilidade $\geq 70\%$ e vigor ≥ 3 foram processados para serem utilizados no experimento (CBRA, 1998).

A diluição foi realizada com BTS – Beltsville Thawing Solution - VITASEM LD de longa duração, Magapor S.L.®, Espanha (BTS: mOsm/kg 290-320; pH 6,9-7,5), e o volume utilizado do diluente foi calculado de acordo com a concentração e volume de cada ejaculado. As DI apresentavam concentrações de 2×10^9 de células espermáticas em 80 mL, embaladas pelo sistema automático GTB 600 (IMV® Brasil, São Paulo, SP, Brasil) em *blisters* identificados com o código do macho e validade do produto.

4.4 Curva de resfriamento

As doses foram mantidas por 10min/21°C, após esse período, estocados em conservadora de sêmen por 90min/17°C, para estabilização das células junto ao diluente e centrifugadas a $400 \times g$ por 10min. Ao fim, foi retirado o sobrenadante (plasma seminal adicionada de BTS) e o *pellet* (células espermáticas) foi re-suspenso pelo diluente de resfriamento.

4.5 Diluente de resfriamento

O diluente de resfriamento (DR) foi preparado no Laboratório de Reprodução da UFPEL (Repropel), em período anterior ao da coleta das amostras. Composto de 80% do volume de solução de lactose a 11% (Sigma-Aldrich® Chemical Company, St. Louis, MO - USA) e 20% de gema de ovo (v/v), mantido sob congelamento até momentos antes de sua utilização na CIA. Foi adicionado ao *pellet* em volume suficiente para que se obtenha $2/3$ da concentração final da palheta de congelamento do sêmen (500×10^6 espermatozoides/0,5mL). As amostras mantiveram-se em microtubos em conservadora de sêmen com temperatura controlada em 5°C/90 min, até serem completadas com o diluente de congelamento.

4.6 Diluente de congelamento

O diluente de congelamento (DC) também preparado em período anterior no Laboratório Repropel/UFPEL, foi acrescido às amostras, completando mais $1/3$ do volume total de diluente. Perfazendo um volume total de 0,5mL em cada microtubo,

com concentração final de 500×10^6 espermatozoides. Dessa forma, se obtém 2/3 de DR e 1/3 de DC.

O diluente de congelamento foi composto a partir do DR, sendo o DC (89,5% de DR + 1,5% (Equex-Paste®, NovaChemical Sales, MA - USA) e 9% de Glicerol, v/v). No diluente de congelamento pronto, foi adicionado ainda, uma suplementação com ATP exógeno (Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate - Sigma-Aldrich®) em diferentes concentrações, configurando os tratamentos utilizados no experimento: T1 (DC sem ATP); T2 (DC com 0,025mM de ATP); T3 (DC com 0,25mM de ATP); T4 (DC com 2,5mM de ATP) e T5 (DC com 25,0 mM de ATP).

4.7 Congelamento

Cada microtubo *eppendorf*® com 0,5mL da amostra e seu respectivo tratamento foi transferido para palheta de 500µL, identificadas e vedadas com álcool polivinílico. Contendo uma concentração de 500×10^6 células/palheta. O procedimento foi realizado em uma conservadora de sêmen, adaptada para manter ambiente rigoroso a 5°C. As palhetas foram colocadas horizontalmente em vapor de nitrogênio líquido (N₂L) a 5 cm acima do nível (-60/-80°C)/20min e após mergulhadas em N₂L à -196°C e armazenadas em botijão de nitrogênio através de raques, e mantidas até o descongelamento. Processo realizado na central de IA. As amostras ficaram armazenadas por no mínimo 30 dias.

4.8 Descongelamento

As palhetas sofreram descongelamento em banho-maria a 37°C/20 seg. Foram alocadas em microtubos de 500µL para diluição, retirou-se uma alíquota de 100µL e foi colocada em tubo de 1,5mL com 900µL de BTS + BSA previamente aquecidos (3mg de BSA/mL de BTS). Incubadas em placa aquecedora à 37°C/10min para ativação dos espermatozoides e posteriormente avaliação dos parâmetros de cinética espermática. Outra alíquota de 200µL dessa solução é retirada e colocada em refrigeração para análise das estruturas (integridade de membrana, acrossoma, mitocôndria, fluidez de membrana e DNA) e a bioquímica dos espermatozoides (ROS e LPO).

4.9 Análises da cinética espermática

O sêmen descongelado foi avaliado quanto aos parâmetros de cinética pelo sistema computadorizado de avaliação seminal (CASA - Computer Assisted Sperm Analysis) Sperm Vision 3.5, Minitub® e os espermatozoides ativados foram gravados e analisados no sistema. Uma alíquota (3µL) do sêmen já diluído e incubado é retirada e colocada em lamina pré- aquecida de quatro câmaras, utilizando uma para cada amostra, com captura em 6 campos de leitura com no mínimo 1000 células gravadas. De acordo com Verstegen et al. (2002) os parâmetros reportados pelo CASA são: motilidade total MT (%), motilidade progressiva MP (%), distância média percorrida DAP (µm), distância curvilínea DCL (µm), distância retilínea DSL (µm), velocidade curvilínea VCL (µm/s), velocidade média do percurso VAP (µm/s), velocidade linear progressiva VSL (µm/s), retilinearidade STR (VSL / VAP, %), e linearidade LIN (VSL/VCL, %), deslocamento lateral da cabeça ALH (µm), frequência de batimento cruzado BCF(Hz) .

As análises foram avaliadas em três tempos após o descongelamento: imediatamente, após a ativação dos espermatozoides e, após uma e duas horas, mantidos em placa aquecida.

4.10 Análises das estruturas celulares

As estruturas celulares foram analisadas pelo Citometro de fluxo, Attune® Cytometer Versão 2.1.0 do software (Life Technologies). Equipado com laser azul (Argônio 488 nm) e laser violeta (UV 405 nm). Em todas as avaliações foram utilizadas uma alíquota de 10µL de amostra seminal e 10µL de sonda fluorescente, específica para cada tipo de avaliação, incubadas por 10 min/37°C em placa aquecida. Posteriormente a este período, é adicionado 20µL de solução de *Hoechst* 33342 (10mg/mL), exceto na fragmentação de DNA. E por fim, são adicionados mais 500µL de solução salina tamponada (PBS) com EDTA para ser feita a leitura no citometro. Dez mil células espermáticas são coletadas por amostra.

A Integridade da membrana plasmática foi analisada pelo processo de permeabilização da conjugação do iodeto de propídio e da carboxifluoresceínadiacetate. Os espermatozoides são classificados em viáveis/não

lesados e não viáveis/lesados (GILLAN et al., 2005; FERNÁNDEZ-GAGO et al., 2013). Os dados são expressos pelo percentual de espermatozoides nas categorias.

Para a fluidez de membrana plasmática foi utilizado corante fluorescente hidrofóbico, a merocianina 540 e 0,1 μ M de YO PRO-1 (Invitrogen - Eugene, OR, EUA). E as células são classificadas em alta fluorescência (alta fluidez) e baixa fluorescência (baixa fluidez) (FERNÁNDEZ-GAGO et al., 2013). Os dados são expressos pelo percentual de espermatozoides nas categorias.

A reação do acrossoma foi estimada utilizando alectina PNA combinado com FITC. Os espermatozoides são classificados como: células com acrossoma não reagido e células com acrossoma reagido (PETRUNKINA et al., 2005). Os dados são expressos pelo percentual de espermatozoides nas categorias.

A funcionalidade de mitocôndria foi avaliada utilizando Rhodamina 123, corante sequestrado nas mitocôndrias que emite fluorescência verde na mitocôndria ativa (GILLAN et al., 2005). As células foram classificadas quanto à alta funcionalidade (alta fluorescência) e baixa funcionalidade (baixa fluorescência). Somente espermatozoides intactos foram avaliados.

A fragmentação do DNA foi determinada utilizando as propriedades da sonda metacromática laranja de acridine, no ensaio de estrutura de cromatina espermática (EVENSON et al., 1994). Adicionado 5 μ L de TNE (0.01 M Tris-HCl; 0.15 M NaCl; 0.001 M EDTA; pH 7,2), 10 μ L de Triton (Triton X-100, 1%). Os espermatozoides foram classificados quanto DNA integro (verde) e fragmentado (laranja/vermelho) (JENKINS et al., 2015).

A produção de ROS foi avaliada com o corante fluorescente 2',7'-diacetato diclorofluoresceína, que é oxidado por ROS intracelular. Foi utilizada para análise a mediana da intensidade de fluorescência verde (DOMINGUEZ-REBOLLEDO et al., 2011).

Na peroxidação lipídica dos espermatozoides, foi adicionado uma concentração final de 1 μ M Bodipy C11 (HAGEDORN et al., 2012) em 10 μ L da amostra, e incubados por 2 horas. Foram analisados apenas espermatozoides vivos. A peroxidação lipídica foi calculada através da intensidade mediana da fluorescência vermelha (lipídio não peroxidado)/intensidade mediana de fluorescência verde + intensidade mediana de fluorescência vermelha (lipídio não peroxidado).

4.11 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à ANOVA, comparando-se as médias pelo teste de Tukey (5%) para as diferentes concentrações de ATP. Foi utilizado o software Statistix 13[®].

5 Resultados e discussão

Os resultados das amostras controles são superiores ao encontrado em outros trabalhos com congelamento de sêmen suíno (JUONALA et al. 1998, CORCINI et al., 2012; WASILEWSKA et al., 2016), confirmando a correta manipulação nos processos de resfriamento, congelamento e descongelamento do sêmen suíno. A adição de 0,25 mM de ATP exógeno ao diluente de congelamento de sêmen suíno apresentou uma diferença significativa do controle, evidenciando aumento na motilidade total dos espermatozoides no período recente do descongelamento (tempo zero). Esse parâmetro também diferiu nos demais tratamentos ($P < 0,05$), e o diluente com maior concentração de ATP (25mM) foi o que apresentou menor motilidade (Tab. 1). Da mesma forma, a motilidade progressiva nesse mesmo período de tempo, pós-descongelamento, obteve melhor resultado ($P < 0,05$) no tratamento com 0,25mM de ATP, e piores com concentrações acima desse valor (Tab. 1).

Tabela 1: Motilidade total e progressiva em três tempos nos diferentes tratamentos com ATP. Os dados são expressos como média e erro padrão da média.

Variáveis	Tempo (h)	Tratamentos (ATP)				
		Controle	0,025mM	0,25mM	2,5mM	25mM
M TOTAL (%)	0	40,1 ± 1,0 ^b	41,0 ± 0,7 ^{ab}	44,1 ± 1,1 ^a	39,8 ± 1,0 ^b	27,8 ± 0,9 ^c
M PROG (%)		30,8 ± 0,9 ^{ab}	30,9 ± 0,6 ^{ab}	33,7 ± 1,0 ^a	30,0 ± 0,9 ^b	17,6 ± 0,8 ^c
M TOTAL (%)	1	19,7 ± 1,0 ^a	19,7 ± 0,7 ^a	21,0 ± 0,8 ^a	23,2 ± 0,9 ^a	21,8 ± 1,1 ^a
M PROG (%)		13,5 ± 0,9 ^a	13,0 ± 0,6 ^a	14,0 ± 0,7 ^a	15,5 ± 0,7 ^a	14,5 ± 1,0 ^a
M TOTAL (%)	2	12,2 ± 0,7 ^b	13,5 ± 0,6 ^b	13,8 ± 0,7 ^b	13,8 ± 0,7 ^b	17,2 ± 0,9 ^a
M PROG (%)		7,3 ± 0,6 ^b	8,1 ± 0,5 ^b	7,9 ± 0,6 ^b	8,6 ± 0,6 ^{ab}	10,5 ± 0,7 ^a

*Motilidade total (M TOTAL), motilidade progressiva (M PROG). Letras distintas na mesma linha apresentam diferença estatística ($P < 0,05$).

Após uma hora do descongelamento, mesmo estando às células em temperatura adequada (37°C), ocorreu queda da motilidade total e progressiva em todos os tratamentos e não se verificou diferenças significativas nas médias (Tab. 1). Entretanto, duas horas após o descongelamento, o tratamento com maior concentração, foi o que apresentou resultado ($P < 0,05$) com menor queda da motilidade (Tab. 1). Contrariando as respostas dos outros tempos. Pode-se entender

que concentrações altas de ATP, alteram a relação ATP/ADP interferindo no metabolismo energético, porém, mantém a célula viável por mais tempo.

A motilidade espermática é um atributo marcante para o potencial fertilizante do macho, e considerando que, a fonte imediata de energia para este parâmetro, é a hidrólise do ATP pela ATPase. Foi possível observar que a célula espermática de suínos não consegue manter o equilíbrio entre o consumo de energia e o metabolismo energético com concentrações maiores de 2,5 mM de ATP, no descongelamento (tempo zero). Além disso, um aumento excessivo do ATP pode ter gerado um feedback negativo na célula espermática, inibindo a ação da ATPase que é estimulada pelo aumento de ADP (COSSON, 2012), ficando as motilidades em concentrações maiores de 2,5 mM de ATP reduzidas. Com esses resultados foi verificado que a célula espermática de suínos não pode ser armazenada em baixas temperaturas em meio contendo mais de 2,5 mM de ATP.

Foi verificado em bovinos que a concentração de ATP no sêmen fresco é de $76 \pm 38 \text{ nmol}/10^8$ enquanto que no congelado/descongelado é de $10 \pm 4.7 \text{ nm}/10^8$ (HAMMERSTAEDT, 1981). Desta forma, mesmo com o decréscimo da concentração de ATP endógeno durante o processo de criopreservação da célula ainda existe uma inadequada utilização do ATP exógeno, como suplementação ao desgaste energético natural que ocorre a célula (perda de ATP intracelular), devido aos processos de congelamento/descongelamento. O estresse térmico também pode resultar em dano à mitocôndria, levando ao comprometimento do metabolismo energético dos espermatozoides e também aumento na produção de substâncias reativas ao oxigênio (ROS), estando relacionado com a queda na motilidade espermática (SCHÖBER et al., 2007).

Os valores médios da velocidade progressiva (VSL) e velocidade média (VAP) no tempo zero, não diferiram entre os tratamentos com 0,025mM, 0,25mM e 2,5mM de ATP do controle, porém, as velocidades apresentaram diferença no tratamento mais concentrado (25mM), estando este com velocidade inferior dos demais (Tab. 2). A velocidade curvilínea (VCL) foi melhor no tratamento três (0,25mM), porém não diferiu do controle. A VCL, em tempo zero, teve resultado menos satisfatório no tratamento cinco (25mM).

Tabela 2: Valores de velocidade curvilínea (VCL), velocidade média (VAP) e velocidade progressiva (VSL) nos três tempos e cinco concentrações de ATP

Variáveis	Tempo (h)	Tratamentos				
		C	0,025mM	0,25mM	2,5mM	25mM
VAP ($\mu\text{m/s}$)	0h	$44,8 \pm 0,5^a$	$43,7 \pm 0,6^a$	$45,3 \pm 0,7^a$	$44,6 \pm 0,6^a$	$34,3 \pm 0,5^b$
VCL ($\mu\text{m/s}$)		$70,0 \pm 0,7^{ab}$	$68,7 \pm 0,8^b$	$72,6 \pm 1,3^a$	$70,7 \pm 0,7^{ab}$	$55,4 \pm 0,8^c$
VSL ($\mu\text{m/s}$)		$37,9 \pm 0,5^a$	$36,7 \pm 0,6^a$	$37,5 \pm 0,6^a$	$37,6 \pm 0,5^a$	$27,0 \pm 0,4^b$
VAP ($\mu\text{m/s}$)	1h	$31,6 \pm 0,6^{ab}$	$29,8 \pm 0,6^b$	$31,5 \pm 0,6^{ab}$	$33,0 \pm 0,6^a$	$32,9 \pm 0,5^a$
VCL ($\mu\text{m/s}$)		$48,0 \pm 0,9^b$	$44,4 \pm 0,8^c$	$47,6 \pm 0,8^{bc}$	$48,7 \pm 0,9^{ab}$	$51,7 \pm 0,8^a$
VSL ($\mu\text{m/s}$)		$26,4 \pm 0,6^{ab}$	$25,0 \pm 0,5^b$	$26,5 \pm 0,6^{ab}$	$27,6 \pm 0,6^a$	$26,3 \pm 0,4^{ab}$
VAP ($\mu\text{m/s}$)	2h	$26,9 \pm 0,7^b$	$28,4 \pm 0,6^b$	$28,3 \pm 0,8^b$	$27,9 \pm 0,7^b$	$32,1 \pm 0,5^a$
VCL ($\mu\text{m/s}$)		$40,6 \pm 1,1^b$	$43,1 \pm 0,9^b$	$42,1 \pm 1,2^b$	$42,4 \pm 1,1^b$	$49,2 \pm 0,9^a$
VSL ($\mu\text{m/s}$)		$22,0 \pm 0,6^b$	$23,2 \pm 0,5^b$	$23,0 \pm 0,7^b$	$23,0 \pm 0,7^b$	$25,7 \pm 0,5^a$

* Valores com expoentes diferentes na linha indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

No tempo de uma hora após descongelamento todas velocidades apresentaram resultados semelhante estatisticamente ($P < 0,05$), considerado os melhores nas concentrações de ATP acima de 2,5mM e, somente VCL diferiu do controle (Tab. 2). Segundo Verstegen et al (2002), a VCL é sempre a maior das três velocidades, e indica a real velocidade da trajetória do espermatozoide, também serve como elemento de cálculo para a linearidade.

Em duas horas após descongelamento as células espermáticas do diluente com concentração de 25mM, mantiveram-se constante ($P < 0,05$) em relação as dos outros tratamentos e tempos de velocidades (Tab. 2).

Tabela 3: Distâncias percorridas pela célula espermática nos diferentes tratamentos com ATP em três tempos

Variável	Tempo	Tratamentos				
		T1 (Controle)	T2 (0,025mM)	T3 (0,25mM)	T4 (2,5mM)	T5 (25mM)
DAP (μm)	0h	20,4 $\pm$ 0,2 ^a	19,9 $\pm$ 0,3 ^a	20,5 $\pm$ 0,3 ^a	20,3 $\pm$ 0,2 ^a	15,0 $\pm$ 0,2 ^b
DCL (μm)		31,9 $\pm$ 0,3 ^{ab}	31,3 $\pm$ 0,4 ^b	33,0 $\pm$ 0,5 ^a	32,3 $\pm$ 0,3 ^{ab}	24,5 $\pm$ 0,4 ^c
DSL (μm)		17,2 $\pm$ 0,2 ^a	16,7 $\pm$ 0,2 ^a	17,0 $\pm$ 0,2 ^a	17,1 $\pm$ 0,2 ^a	11,9 $\pm$ 0,2 ^b
DAP (μm)	1h	14,4 $\pm$ 0,3 ^{ab}	13,8 $\pm$ 0,2 ^b	14,5 $\pm$ 0,3 ^{ab}	15,0 $\pm$ 0,3 ^{ab}	14,5 $\pm$ 0,3 ^a
DCL (μm)		21,9 $\pm$ 0,4 ^{ab}	20,5 $\pm$ 0,4 ^b	21,9 $\pm$ 0,4 ^{ab}	22,3 $\pm$ 0,4 ^a	22,9 $\pm$ 0,4 ^a
DSL (μm)		12,0 $\pm$ 0,3 ^{ab}	11,5 $\pm$ 0,2 ^b	12,1 $\pm$ 0,3 ^{ab}	12,6 $\pm$ 0,3 ^a	11,6 $\pm$ 0,2 ^b
DAP (μm)	2h	12,2 $\pm$ 0,3 ^b	12,9 $\pm$ 0,2 ^{ab}	12,8 $\pm$ 0,4 ^b	12,6 $\pm$ 0,3 ^b	14,1 $\pm$ 0,2 ^a
DCL (μm)		18,3 $\pm$ 0,5 ^b	19,6 $\pm$ 0,4 ^b	19,1 $\pm$ 0,5 ^b	19,2 $\pm$ 0,5 ^b	21,8 $\pm$ 0,4 ^a
DSL (μm)		10,0 $\pm$ 0,3 ^b	10,5 $\pm$ 0,2 ^{ab}	12,1 $\pm$ 0,3 ^{ab}	10,4 $\pm$ 0,3 ^{ab}	11,3 $\pm$ 0,2 ^a

* Distância média percorrida (DAP), Distância curvilínea (DCL), Distância retilínea DSL. Valores com expoentes diferentes na linha diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

A concentração maior de ATP, também apresentou diferença ($P < 0,05$), nas distâncias médias, curvilínea e retilínea percorridas pelos espermatozoides no pós-descongelamento, estando abaixo das outras (Tab. 3), porém, as distâncias mais percorridas foram no tratamento três, sem diferenciar do controle. De contra partida, nos tempos de 1h e 2h as distâncias com maior percurso foram nos tratamentos acima de 2,5mM (Tab. 3). Desta forma, fica claro neste trabalho, que os tratamentos com maior concentração, beneficia as células espermáticas após um determinado tempo (1-2h) do descongelamento, mas não traz benefícios a célula imediatamente após descongelamento, que por algum mecanismo ainda não bem esclarecido, promove algum grau de toxicidade aos espermatozoides, visto pelos padrões de qualidade seminal.

A amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH) é um dos parâmetros com efeito direto na fertilização, por avaliar o deslocamento médio da cabeça do espermatozoide em sua trajetória, estando relacionada com a capacidade de penetração na zona pelúcida do oócito. Essa variável da cinética espermática apresentou diferença estatística ($P < 0,05$) no tratamento cinco (25mM), em todos os tempos, diferindo dos controles (Tab. 4). A frequência de batimento flagelar é uma variável que corresponde com o número de vezes que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento, nessa variável apresentou diferença ($P < 0,05$) o

tratamento mais concentrado, no tempo zero (Tab. 4), com menor batimento flagelar. No entanto, resultado significativo positivo obteve-se também, no tratamento cinco, duas horas pós descongelamento. Em uma hora depois de descongelado essa variável não mostrou diferença.

Tabela 4: Valores médios para amplitude do deslocamento lateral (ALH μ m) da cabeça e frequência de batimento flagelar (BCF μ m)

Variáveis	Tempos (h)	Tratamentos				
		Controle	0,025mM	0,25mM	2,5mM	25mM
ALH	0	1,7 $\pm$ 0,02 ^c	1,8 $\pm$ 0,03 ^{bc}	1,9 $\pm$ 0,03 ^b	1,8 $\pm$ 0,02 ^{bc}	2,1 $\pm$ 0,03 ^a
ALH	1	1,5 $\pm$ 0,04 ^b	1,3 $\pm$ 0,03 ^c	1,4 $\pm$ 0,03 ^{bc}	1,5 $\pm$ 0,04 ^b	2,1 $\pm$ 0,04 ^a
ALH	2	1,3 $\pm$ 0,05 ^b	1,5 $\pm$ 0,05 ^b	1,5 $\pm$ 0,06 ^b	1,4 $\pm$ 0,05 ^b	2,0 $\pm$ 0,05 ^a
BCF	0	36,7 $\pm$ 0,8 ^a	36,1 $\pm$ 0,3 ^a	36,5 $\pm$ 0,3 ^a	37,0 $\pm$ 0,2 ^a	29,6 $\pm$ 0,4 ^b
BCF	1	29,3 $\pm$ 0,5 ^a	28,5 $\pm$ 0,5 ^a	29,0 $\pm$ 0,5 ^a	29,1 $\pm$ 0,4 ^a	28,9 $\pm$ 0,4 ^a
BCF	2	25,6 $\pm$ 0,7 ^b	26,2 $\pm$ 0,5 ^b	26,1 $\pm$ 0,7 ^b	25,9 $\pm$ 0,7 ^b	28,9 $\pm$ 0,4 ^a

*ALH: Amplitude do deslocamento lateral da cabeça, BCF: Frequência de batimento flagelar. Valores com expoentes diferentes na linha diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

A retilinearidade (STR) e a linearidade (LIN) são percentuais entre VSL e VAP e VSL e VCL, respectivamente. A LIN diminui à medida que o espermatozoide se afasta da linha reta (MORTIMER, 2000). Os valores de LIN e STR são determinados como raio dos valores da velocidade (AMANN & KATZ, 2004). Nas duas variáveis, o tratamento com 25mM de ATP apresentou menor medida, contudo, no tempo de duas horas não diferenciou (Tab. 5).

Tabela 5: Retilinearidade e Linearidade das células espermáticas nos três tempos (0h, 1h e 2h).

Variáveis	Tempos (h)	Tratamentos				
		Controle	0,025mM	0,25mM	2,5mM	25mM
STR	0	0,83 ^a	0,83 ^{ab}	0,82 ^b	0,83 ^{ab}	0,78 ^c
STR	1	0,82 ^a	0,83 ^a	0,82 ^a	0,83 ^a	0,79 ^b
STR	2	0,77 $\pm$ 0,01 ^a	0,80 ^a	0,79 $\pm$ 0,01 ^a	0,78 $\pm$ 0,01 ^a	0,79 ^a
LIN	0	0,53 ^a	0,52 ^{ab}	0,51 ^b	0,52 ^{ab}	0,48 ^c
LIN	1	0,54 ^b	0,56 ^{ab}	0,55 ^{ab}	0,56 ^a	0,50 ^c
LIN	2	0,51 $\pm$ 0,01 ^a	0,54 ^a	0,53 ^a	0,51 $\pm$ 0,01 ^a	0,52 ^a

*valores com expoentes diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

Em estudos achados de Edwards et al. (2007), falam que a cinética de uma população de espermatozoides com motilidade subótima pode ser parcialmente melhorada pelo ATP exógeno mas que esta resposta não é idêntica em populações com alta motilidade. Uma explicação para esta discrepância é que muitos espermatozoides na população de alta motilidade já atingiram sua VSL máxima.

Por algum fato, ainda desconhecido, não se estabeleceu ao certo o mecanismo de incorporação do ATP exógeno na célula espermática.

A hipótese levantada por esse trabalho de que o ATP disponibiliza mais energia a célula e com isso um aumento da motilidade espermática do suíno, se confirma pelo tratamento com 0,25mM de ATP, porém, há ainda grande discrepância dos parâmetros cinéticos, e, mais estudos no entendimento do mecanismo de ação se faz necessário. No entanto, a concentração de 0,25mM de ATP se mostrou mais eficaz de todas e pode ser uma alternativa, como suplemento no diluente de congelamento, em machos suínos que possuem uma baixa produção de ATP na célula espermática (menos que 20 nmol/10⁸) (MANN LUTWAK-MANN, 1981).

Tabela 6: Análises de citometria de fluxo de espermatozoides descongelados com diluentes em diferentes concentrações de ATP. Os dados são expressos como média e erro padrão da média.

	Tratamentos				
	Controle	0,025mM	0,25mM	2,5mM	25mM
ROS (%)	613,00 ± 81,7 ^a	611,06 ± 70,5 ^a	627,42 ± 93,9 ^a	612,52 ± 80,7 ^a	459,37 ± 55,5 ^a
IM (%)	18,91 ± 1,7 ^a	22,48 ± 1,7 ^a	22,94 ± 1,9 ^a	22,17 ± 1,7 ^a	20,63 ± 1,5 ^a
RC (%)	67,87 ± 1,9 ^a	58,34 ± 2,1 ^b	56,89 ± 2,1 ^b	63,02 ± 1,8 ^{ab}	60,97 ± 1,8 ^{ab}
RA (%)	87,44 ± 3,1 ^a	86,87 ± 3,3 ^a	83,83 ± 3,5 ^a	85,21 ± 3,5 ^a	83,18 ± 3,8 ^a
FM (%)	19,16 ± 3,6 ^a	19,62 ± 3,4 ^a	19,26 ± 3,0 ^a	21,24 ± 4,4 ^a	28,25 ± 4,2 ^a
LPO (%)	30,65 ± 1,6 ^a	29,86 ± 1,9 ^a	26,80 ± 1,7 ^a	28,49 ± 1,7 ^a	27,96 ± 1,9 ^a
PMit (%)	82,20 ± 1,4 ^b	79,51 ± 2,1 ^b	81,81 ± 1,9 ^b	81,45 ± 2,0 ^b	83,51 ± 2,0 ^a
DFI (%)	0,09 ^{ab}	0,08 ^{ab}	0,08 ^{ab}	0,11 ± 0,01 ^a	0,08 ^b

*Espécies reativas de oxigênio (ROS), Integridade de membrana citoplasmática (IM), Integridade celular (IC), Reação do Acrossoma (RA), Fluidez de membrana citoplasmática (FM), Peroxidação lipídica (LPO), Potencial de membrana mitocondrial (PMit), Fragmentação de DNA (DFI), de espermatozoides descongelados com ATP (mM).

O choque térmico e a exposição ao oxigênio atmosférico, decorrentes do processo de criopreservação, tornam as células suscetíveis à formação de ROS (espécies reativas do oxigênio) (KARAJI et al 2014). Um nível de ROS é importante

para funções espermáticas como capacitação, reação acrossômica e fusão com oócitos (AITKEN, 1999), no entanto, níveis altos dificultam a manutenção da integridade da membrana, ocasionando prejuízos à célula espermática pela peroxidação lipídica (LPO) (BANSAL E BILASPURI, 2011). Os resultados da bioquímica celular, ROS e LPO não foram diferentes do controle, dessa forma, a adição de ATP nas diferentes concentrações, não interferiu nestas análises (Tab. 6). Com estes resultados, podemos sugerir que a capacidade antioxidante total (CAT) também não foi alterada, como o ROS não diferiu se a CAT tivesse sofrido algum efeito, está teria influenciado diretamente a peroxidação lipídica.

O processo de criopreservação do sêmen pode modificar a conformação dos fosfolipídios da membrana plasmática, pela mudança de fases do estado líquido cristalino para o gel (BORGES et al., 2011; LEVIS, 2000), dessa forma alterando a permeabilidade e fluidez da membrana plasmática (KHOSRO BEYGI & ZARGHAMI, 2007; LEVIS, 2000). Os resultados da adição de ATP no diluente não indicaram alterações significativas de fluidez, e portanto, não interferindo na passagem de íons e pequenas moléculas pela membrana (Tab. 6).

A membrana plasmática é o componente mais externo da célula e envolve todo o espermatozóide (KHOSRO BEYGI E ZARGHAMI, 2007), é uma estrutura fina, flexível e seletivamente permeável, formada quase que inteiramente por proteínas e lipídios (GUYTON E HALL, 1997). Manter sua integridade é fator fundamental para o bom funcionamento da célula, e homeostase do espermatozóide. Não foram detectadas diferenças estatísticas nesse parâmetro (Tab. 6), porém para o rompimento celular da mesma, os tratamentos com 0,025mM e 0,25mM foram os que menor apresentaram rompimento celular da membrana plasmática.

A reação acrossômica é um teste que monitora sua integridade, ou seja, o percentual de células em que não houve rompimento do acrossoma. A reação do acrossoma é um dos requisitos necessários para a fertilização e ocorre durante exposição a uma glicoproteína que compõe a zona pelúcida do oócito no trato reprodutivo da fêmea (GADELLA et al., 2008), não devendo acontecer em outro momento. Neste estudo com ATP, a integridade do acrossoma manteve-se intacta, sem apresentar diferenças (Tab. 6). Sendo assim relevante para a viabilidade do espermatozoide no momento da fusão com o oócito.

A funcionalidade da mitocôndria é a análise que avalia o percentual de células com potencial mitocondrial alto, sem rompimento. Está análise tem forte relação com

o potencial energético da célula, por ser a organela responsável pelas vias metabólicas relacionadas a produção de ATP. Sendo assim, logo está relacionada com a motilidade seminal. Apesar de, nesse estudo, ter mostrado um resultado melhor no tratamento com 0,25mM de ATP para a motilidade no descongelamento, foi determinante também, o resultando no tratamento cinco, diferindo dos demais (Tab. 6). Nele percebeu-se um funcionamento mitocondrial melhor, em diluentes com concentração acima de 2,5mM de ATP, mantendo o potencial mitocondrial das células por mais tempo, ou seja, o tratamento que apresentou menor queda da motilidade em tempos de uma e duas horas após descongelamento.

6 Considerações Finais

Nesse estudo foi verificado que o tratamento com 0,25 mM de ATP obteve melhor resultado na cinética espermática, porém, foi observado que após duas horas do descongelamento, os tratamentos com concentrações superiores apresentaram um tempo maior no potencial mitocondrial. Trabalhos que buscam identificar efeitos da adição de ATP exógeno na conservação do sêmen suíno são escassos, pode-se observar que parte dos efeitos esperados, ainda não teve o mecanismo de ação bem esclarecido. Esse estudo foi realizado com machos de alta performance em padrões de qualidade seminal (central de IA), e o ATP exógeno parece funcionar melhor em ejaculados que apresentam nível baixo de ATP endógeno.

Seria interessante mais estudos que esclareçam melhor os benefícios do uso de adenosina trifosfato e suas concentrações, a fim de tornar sua utilização mais necessária na criopreservação do sêmen suíno, e, desta forma, criar diluentes com meios que melhorem o metabolismo energético das células, com resultados na cinética e nas estruturas celulares dos espermatozoides.

A concentração de 0,25mM de ATP se mostrou mais eficaz de todas e poderá ser uma alternativa no diluente de congelamento de sêmen suíno de baixo rendimento espermático.

Referências

AITKEN, R.J; BAKER, M.A. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. **Molecular and Cellular Endocrinology**, n. 250, p. 66–69, 2006.

ALBARRACIN, J.L.; FERNANDEZ-NOVELL, J.M.; BALLESTER, J.; RAUCH M.C.; et al. Gluconeogenesis-linked glycogen metabolism is important in then achievement of 'In vitro' capacitation of dog sperm in a medium without glucose. **Biology Reproduction**, v.71, n.5, p.1437–1445. 2004.

AMANN, R. & KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v.25, p.317-325, 2004.

ANDRÉ, J. (Ed). The sperm cell: fertilizing Power, surface properties, motility, nucleus e acrossome, evolutinary aspects. The Hague: M. Nijhoff. 456 p. 1983.

ANTUNES, R.C. Avanços tecnológicos e aplicabilidade da técnica de congelamento de sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.1, p.60-63, 2007.

ARAMLI, M.S.; KALBASSI, M.R.; NAZARIB, R.M. Effects of short-term storage on the motility, oxidative stress, and ATP content of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) sperm. **Animal Reproduction Science**, v.143, p. 112-117, 2013.

BAILEY, J.L.; LESSARD, C.; JACQUES, J.; BRE´QUE, 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.

BANSAL, A.K; BILASPURI, G.S. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Sêmen Functions. Review Article. **Veterin Medic Intern**, p.1-7. 2011.

BLANCO, J.M.; LONG, J.A.; GEE, G.; WILDT, D.E.; DONOGHUE, A.M. Comparative cryopreservation of avian spermatozoa: Benefits of non-permeating osmoprotectants and ATP on turkey and crane sperm cryosurvival. **Animal Reproduction Science**, v. 123, p. 242–248, 2011.

BATTISTONE, M.; DA ROS, V.; SALICIONI, A.; NAVARRETE, F.; KRAPF, D.; VISCONTI, P.; CUASNICU, P. Functional human sperm capacitation requires both bicarbonate-dependent PKA activation and down-regulation of Ser/Thr phosphatases by Src family kinases. **Molecular Human Reproduction**, v. 19, n. 9, p. 570-580, 2013

BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. **Acta Scientia e Veterinariae**, n. 33, p. 17-32, 2005.

BORGES, J.C.; SILVA, M.R.; GUIMARÃES, J.D.; ESPER, C.R.; FRANCESCHINI, P.H. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 3, p. 303-314, 2011.

BOSMAN, E., et al. Sperm adenosine triphosphate Concentrations before and after freezing as a marker of cryolysis. Archives of andrology 33:7-10 Institute for the Care of women, Medfem Clinic, P.O. Box 2233. Cramerview 2060, South Africa. 1994.

BURNSTOCK, G. Purinergic signaling. **British Journal of Pharmacology**, v.147, p. 172–181, 2006.

CABRITA, E.; ROBLES, V.; CUÑADO, S.; WALLACE, J.C.; SARASQUETE, C. HERRÁEZ, M.P. Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5ml macrotubes. **Cryobiology**, n. 50, p. 273–284, 2005.

CABRITA, E. et al. Review article Cryopreservation os fish sperm: applications and perspectives. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, p. 623-635, 2010.

CALAMERA, J.C.; BRUGO, S.; VILAR, O. Relationship between motility and adenosine triphosphate (ATP) in human spermatozoa. **Andrologia**, n. 14, p. 239-241, 1982.

CÂMARA, D. R.; GUERRA, M.M.P. Mitocôndria espermática: além da síntese de adenosina trifosfato (ATP). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, p. 93-99, 2008.

CAO, W.; HAIG-LADEWIG, L.; GERTON, G.L.; MOSS, S.B. Adenylate kinases 1 and 2 are part of the accessory structures in the mouse sperm flagellum. **Biology of Reproduction**, n. 75, p. 492–500, 2006.

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.J. Conservação de recursos genéticos em peixes: teoria e prática. Curso de treinamento brasileiro. Tradução H. P. Godinho. Victoria, Canada: World fisheriesTrust, p. 47. Datilografado. 1999.

CHULAVATNATOL, M; TREETIPSATIT, N. Initiation of sperm flagellar movement using rat demembrated sperm model: nucleotide especificities. In: ANDRÉ, J. (Ed.). **The sperm cell**. Hague: M. Nijhoff. p. 364-367. 1983.

CORCINI, C.D.; VARELA, A.S.; PIGOZZO, R.; RAMBO, G.; GOULARTE, K.L.; ALDERAM, 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 present in seminal plasma. **Livestock Science**, v.145, n. 1, p. 28-33, 2012.

COPELAND, W.C. Mitochondrial DNA: methods and protocols. Totowa, NJ: Humana Press, 420p. **Methods in Molecular Biology**, v.197, 2002.

COSSON, J.J. ATP, the sperm movement energizer. Chapter 1. In: Kuestler E, Traugott G, editors. Adenosine triphosphate: chemical properties, biosynthesis and functions in cells. New York: Nova Publisher. p. 1–46. 2012

DARSZON, A. et al. Íon channels in sperm physiology. **Physiological Reviews**, v.79, n.2, p. 481-510, 1999.

DE LEEUW, F.E.; CHEN, H.C.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A.J. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. **Cryobiology**, v.27, p.171-183, 1990.

DIDION, B.A.; BRAUN, G.D.; DUGGAN, M.V. Field fertility of frozen boar semen: a retrospective report comprising over 2600 AI services spanning a four year period. **Animal Reproduction Science**, n. 137, p. 189-196, 2013.

DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A.E.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; BISBAL, A.F., et al.. Response of thawed epididymal red deer spermatozoa to increasing concentrations of hydrogen peroxide, and importance of individual male variability. **Reproduction in Domestic Animal**, n.46, p. 393–403, 2011.

EDWARDS, E.; ROSSATO, M. ET AL. Effects of extracellular adenosine 5'-triphosphate on human sperm motility. **Reproductive sciences**, v.14, n. 7, p.655-665, 2007.

EVENSON, D.P.; THOMPSON, L.; JOST, L. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. **Theriogenology**, n. 41, p.637–51, 1994.

FERNANDEZ-GAGO, R.; DOMINGUEZ, J.C.; MARTINEZ-PASTOR, F. Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: a flow cytometry study. **Theriogenology**, v. 80, n. 4, p. 400-410, 2013.

FLORES, E.; FERNÁNDEZ-NOVELL, J.M.; PEÑA, A.; RIGAU, T.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E. Cryopreservation-induced alterations in boar spermatozoa mitochondrial function are related to changes in the expression and location of midpiece mitofusin-2 and actin network. **Theriogenology**, n. 74, p.354–63, 2010.

FORD, W.C. Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? **Human Reproduction Update**, n.12, p. 269-274, 2006.

GADELLA, B.M.; TSAI, P.S.;BOURKE, A.; BREWIS, I.A. Sperm head membrane reorganization during capacitation. **The International Journal of Developmental Biology**, n. 52, p. 473, 2008.

GADELLA, B.M.; VAN GESTEL, R.A. bicarbonate and its role in mammalian sperm function. **Animal Reproduction Science**, n. 82-83, p.307-319, 2004.

GADEA, J.Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine. **Spanish Journal of Agricultural Research**, n.1, p. 17-27, 2003.

GERRITS, R.J.; LUNNEY, J.K.; JOHNSON, L.A.; PURSEL, V.G.; KRAELING, R.R.; ROHRER, G.A.; DOBRINSKY, J.R. Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations. **Theriogenology**, n. 63, p. 283-299, 2005.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, n. 63, p. 445–457, 2005.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiología médica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1014p. 1997.

HAMMERSTAEDT, R.H. Monitoring the metabolic rate of germ cells and sperm Reproductive processes and contraception. McKern K Ed Plenum Press New York, p. 353-372, 1981.

HANCOCK, J.L. & HOWELL, G.J.R. The collection of boar semen. **Veterinary Record**, n. 71, p. 664-665, 1959.

JAISWAL, B.S.; CONTI, M. Calcium regulation of the solute adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n.19, p.10676-10681, 2003.

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

JUONALA, T.; LINTUKANGAS, T.S.; NURTILLA, T.; ANDRSSON, M. Relationship between semen quality and fertility in 106 AI-boars. **Reproduction in Domestic Animals**, n. 33, p. 155-158, 1998.

KARAJI, R.O.; KIA, H.D.; ASHRAFI, I. Effects of in combination antioxidant supplementation on microscopic and oxidative parameters of freeze-thaw bull sperm. **Cell Tissue Bank**, n. 15, p. 461-70, 2014.

KHOSRO BEYGI, A. & ZARGHAMI, N. Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of stress biomarkers in subfertile males. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.77, p.117, 2007.

KIM, Y.H.; HAIDL, G.; SCHAEFER, M.; EGNER, U.; MANDAL, A.; HERR, J.C. Compartmentalization of a unique ADP/ATP carrier protein SFEC (Sperm Flagellar Energy Carrier, AAC4) with glycolytic enzymes in the fibrous sheath of the human sperm flagellar principal piece. **Developmental Biology**, n. 302, p. 463-476, 2007.

KRISFALUSI, M.; MIKI, K.; MAGYAR, P.L.; O'BRIEN, D.A. Multiple glycolytic enzymes are tightly bound to the fibrous sheath of mouse spermatozoa. **Biology of Reproduction**, n. 75, v. 2, p. 270–278, 2006.

LEVIS, D. Liquid boar semen production: current extender technology and where do we go from here. In: International conference on boar semen preservation. 4., Beltsville, Maryland USA. Proceedings Lawrence : Allen,. p.121-128, 2000.

LURIA, A.; RUBINSTEIN, S.; LAX, Y.; BREITBART, H. Extracellular adenosine triphosphate stimulates acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa via P2 purinoceptor. **Biology of Reproduction**, n. 66, p. 429–37, 2002.

MANN, T. & LUTWAK-MANN, C. Male Reproductive Function and semen: General Considerations, Springer-Verlag. Chapter. p. 1-37, 1981.

MEDRANO, A. et al. Utilization of different monosaccharides by boar sperm. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 39, n. 4, p. 259-262, 2004.

MIKI, K.; QU, W.; GOULDING, E.H.; WILLIS, W.D.; BUNCH, D.O.; STRADER L.F.; PERREAULT, S.D.; EDDY, E.M.; O'BRIEN, D.A. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)**, n. 101, p.16501-16506, 2004.

MORTIMER, S.T. Casa- Practical aspects. **Journal of Andrology**, p.515-524, 2000.

MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v. 3, n. 5, p. 403-439, 1997.

NELSON, D. L. E COX, M.M. Lehninger. Principles of biochemistry. 4th ed., New York: Worth publishers. pp.527-566, 2004.

PALOMO, M.J.; FERNANDEZ-NOVELL, J.M.; PEÑA, A.; GUINOVART, J.J.; RIGAU, T.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E. Glucose- and fructose-induced dog-sperm glycogen synthesis shows specific changes in the location of sperm glycogen deposition. **Molecular Reproduction and Development**, v.64, p.349-359, 2003.

PEGG, D.E. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols Methods. In: **Molecular Biology**. 2nd edn. Totowa: Humana Press Inc., 348p, 2007.

PETRUNKINA, A.M.; VOLKER, G.; BRANDT, H., et al.,. Functional significance of responsiveness to capacitating conditions in boar spermatozoa. **Theriogenology**, n. 64, p. 1766–1782, 2005.

PURSEL, V.G.; PARK, S. **Freezing and thawing procedures for boar spermatozoa**. In: International conference on deep freezing of boar semen, 1, Uppsala. Proceedings. p.147-166. 1985.

RAMALHO-SANTOS, J.; VARUM, S.; AMARAL, S.; MOTA, P.C.; SOUSA, A.P.; AMARAL, A. Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. **Human Reproduction Update**, n. 15, p. 553 - 572, 2009.

RAMIÓ-LLUCH, L. et al. Oligomycin A-induced inhibition of mitochondrial ATP-synthase activity suppresses boar sperm motility and in vitro capacitation achievement without modifying overall sperm energy levels. **Reproduction, fertility and development**, v. 26, n.6, p. 883-897, 2013.

RODRÍGUEZ-MIRANDA, E.; BUFFONE, M.G.; EDWARDS, S.E.; ORD, T.S.; LIN, K.; SAMMEL, M.D.; GERTON, G.L.; MOSS, S.B.; WILLIAMS, C.J. Extracellular Adenosine Triphosphate Alters Motility and Improves the Fertilizing Capability of Mouse Sperm. **Biology of Reproduction**, n. 79, p. 164–171, 2008.

ROMERO, C.; ALBA, C.; MARTINEZ, P.C.; PASCUAL, M.A.H. Situação atual de novas tecnologias na reprodução de suínos. **Suínos e Cia**, v. 2, n. 6, p: 28-33. 2004.

RUBINSKY, B. Principles of low temperature cell preservation. **Heart Failure Reviews**, n.8, p. 277-284, 2003.

SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; NAGY, S.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUES-MARTINES, H. Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effects on sperm viability. **Theriogenology**, n.63, p.1320-1333, 2005.

SCHOBBER, D.; AURICH, C.; NOHL, H.; GILLE, L. Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. **Theriogenology**, n. 68, p. 745–54, 2007.

SIMPSON, A.M.; WHITE, I. G. interrelationship between motility CAMP, respiration and calcium uptake of ram and boar sperm. **Animal Reproduction Science**, v.15, n.2-3, p.189-207, 1987.

ST JOHN, J.C.; JOKHI, R.P; BARRATT, C.L.The impact of mitochondrial genetics on male infertility. **International Journal of Andrology** v.28, p.65-73, 2005.

TAKEI, G.L.; MIYASHIRO,D.; MUKAI,C.; OKUNO,M. Glycolysis play an important role in energy transfer from the base to the distal end of flagellum in mouse sperm. **Journal of Experimental Biology**, n.217, p. 1876-1886, 2014.

THUWANUT, P.; CHATDARONG, K.; JOHANNISSON, A.; BERGQVIST, AS.;SÖDERQUIST, L.; AXNÉR, E. Cryopreservation of epididymal cat spermatozoa: effects of in vitro antioxidative enzymes supplementation and lipid peroxidation induction. **Theriogenology**, n. 73, p. 1076–87, 2010.

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

TURNER, R. M. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. **Reproduction, Fertility and Development**, n. 18, p. 25–38, 2006.

VADNAIS, M.L.; ALTHOUSE, G.C. Characterization of capacitation, cryoinjury, and the role of seminal plasma in porcine sperm. **Theriogenology**, n.76, p.1508-1516, 2011.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, n. 57, p. 149-179, 2002.

WASILEWSKA, K.; ZASIADCZYK, T., FRASER, L .; KORDAN, W. The benefits of cooling boar semen in long-term extenders prior to cryopreservation on sperm quality characteristics. **Reproduction in Domestic Animals**, n. 51, v. 5, p. 781-788, 2016.

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

WATSON, P.F.; GREEN, C.E. Cooling and capacitation of boar spermatozoa: What do they have in common? In: **INTERNATIONAL CONFERENCE OF BOAR SEMEN PRESERVATION**, Beltsville, Maryland – USA. 2000. p.35-41.