

**ANÁLISE MORFOFUNCIONAL DE ESPERMATOZOIDES SUÍNOS E SUA RELAÇÃO COM
A FERTILIDADE *IN VIVO***

Tainã Figueiredo Cardoso

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Fisiologia Animal Comparada da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Carine Dahl Corcini

Rio Grande, abril 2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem Ele não sou nada;

Aos meus pais, por todo amor e carinho, por acreditarem em mim, e por tornar isso tudo possível;

À minha irmã Thaís, e as minhas avós, por estarem sempre ao meu lado. E ao meu avô, que embora não esteja aqui para ver esse momento com certeza é parte essencial;

Ao meu namorado Juliano, pelo amor e compreensão, e por tornar seus os meus sonhos;

À minha amiga/estagiária/orientadora Estela, pelo companheirismo do dia-a-dia, por me aturar e dividir durante esse projeto, desde as amostras utilizadas até viroses;

À minha orientadora Carine, pela confiança em mim depositada, e ensinamentos que levarei para toda vida;

Ao meu 'orientador' Antonio Sergio, pela amizade, motivação e por tornar as avaliações de citometria possíveis;

Ao professor Adalto Bianchini e a pós-doutoranda Mariana Jorge, pelo auxílio nas análises realizadas;

À Universidade Federal do Rio Grande e à Universidade Federal de Pelotas, em especial ao Laboratório de Reprodução Animal (ReproPel), Grupo de Reprodução Animal Comparada (RAC), e Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, por disponibilizarem estrutura, equipamentos e materiais, tornando esse trabalho possível;

A Généticporc e a Associação dos criadores de suínos do Rio Grande do Sul, em especial ao Tiago Paranhos e ao Vanderlei Koboldt, pela disponibilidade a atenção quanto as amostras e dados;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado;

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram, para o desenvolvimento deste trabalho e para o meu crescimento profissional e pessoal.

Muito obrigada!!

Sumário

RESUMO	4
I. INTRODUÇÃO GERAL.....	6
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
A célula espermática.....	9
Estruturas celulares e sua importância	11
<i>Membrana celular</i>	11
<i>Acrossoma</i>	14
<i>Mitocôndria</i>	15
Estresse oxidativo e a oxidação de moléculas biológicas: Lipídeos, proteínas e DNA..	16
Balanço de íons	17
III. OBJETIVO	19
Objetivo geral	19
Objetivos específicos	19
IV. DESENHO EXPERIMENTAL	20
V. ARTIGO	23
ABSTRACT	25
INTRODUCTION	25
MATERIALS AND METHODS	27
RESULTS	33
DISCUSSION	37
DECLARATION OF INTEREST	41
FINANCING	41
REFERENCES	42
VI. CONCLUSÃO GERAL	51
VII. REFERÊNCIAS GERAIS	52

RESUMO

O espermatozoide é um dos constituintes seminal, sendo essencial para a fertilidade dos indivíduos, uma vez que nele está contido o material genético do progenitor masculino, o qual é transportado através do trato reprodutivo feminino até o encontro com o oócito. No que tange a célula espermática suína, existem poucos relatos acerca de suas particularidades morfofuncionais, principalmente elencando os fatores relacionados e capazes de interferir na fertilidade desses animais. Devido à crescente relevância da espécie como modelo biológico e sua importância na produção comercial, torna-se necessário compreender a célula espermática, no que diz respeito às características estruturais e funcionais, relacionadas ao processo de fertilização. Assim, o presente trabalho avaliou a morfofisiologia da célula espermática, no que tange a motilidade espermática, integridade e fluidez de membrana plasmática, funcionalidade de mitocôndria, reação acrossomal, espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica, oxidação de proteínas carbonil, integridade de DNA, capacidade antioxidante total, balanço iônico intracelular e teste de penetração em oócitos homólogos e relacionou essas características com a fertilidade *in vivo* (taxa de parição). Foi encontrada uma diferença significativa na fertilização *in vivo*, podendo distinguir os animais em animais de alta fertilidade (fertilidade $\geq 70\%$) e animais de baixa fertilidade (fertilidade $< 70\%$). Animais de alta fertilidade apresentam uma maior funcionalidade mitocondrial ($p < 0,05$), menor fluidez de membrana plasmática ($p < 0,01$) e maior capacidade antioxidante total ($p < 0,01$). Sendo essas últimas correlacionadas de forma positiva à fertilidade *in vivo*, $r = 0,77$; $p = 0,0003$ e $r = 0,63$; $p = 0,0049$, respectivamente. Dentre as demais características não foi encontrada nenhuma diferença entre os grupos. Desta forma, este trabalho mostrou algumas características da célula espermática suína e fatores capazes de interferir na fertilidade dos animais. Possivelmente animais de alta fertilidade possuem um maior metabolismo celular, devido a uma maior funcionalidade de mitocôndria, sendo capazes de balancear a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio devido a uma maior capacidade antioxidante, além disso,

essas células, provavelmente também possuem um metabolismo celular mais estável e compatível com os eventos reprodutivos, o que é indicado pela menor fluidez de membrana plasmática. Assim, avaliações como a fluidez de membrana plasmática, capacidade antioxidante total e funcionalidade mitocondrial das células espermáticas destacam-se como marcadores bioquímicos promissores para prever a fertilidade *in vivo* em suínos.

I. INTRODUÇÃO GERAL

O espermatozoide é o principal constituinte seminal, sendo essencial para a fertilidade dos indivíduos, uma vez que nele está contido o material genético do progenitor masculino, o qual é transportado através do trato reprodutivo feminino até o encontro com o oócito (RUSSEL et al., 1990). É considerado uma célula altamente especializada e particular, quando comparada com células somáticas, principalmente por possuir uma membrana plasmática compartimentalizada, mobilidade e pouca substância intracelular (YANAGIMACHI, 1994; CHRISTOVAN et al., 2004, HU et al., 2009).

A espécie suína (*Sus scropha domesticus*) até então, era utilizada basicamente para a produção comercial, e desta forma a pesquisa científica buscou apenas otimizar os processos reprodutivos relacionados com a produção, focando-se em encontrar marcadores proteicos reprodutivos presentes no plasma seminal (MAŇÁSKOVÁ & JONÁKOVÁ et al., 2007; NOVAK et al., 2010; CORCINI et al, 2012). Contudo, quanto às peculiaridades das estruturas e da fisiologia celular da sua célula espermática há poucos relatos, principalmente no que diz respeito à eleição dos fatores capazes de interferir na fertilidade desses animais.

A célula espermática suína possui grandes particularidades quando comparada com outras espécies. Sua membrana plasmática possui uma menor porcentagem de moléculas de colesterol (PAULENZ et al., 1999; JOHNSON et al., 2000), além de uma grande concentração de ácidos graxos poliinsaturados nos fosfolípidos presentes na membrana plasmática - 30% de docosahexanóico e 25% de docosapentaenóico (CEROLINI et al., 2000), tornando esta célula suscetível à peroxidação lipídica, devido ao estresse oxidativo produzido pelas espécies reativas de oxigênio (ERO), principalmente durante seu processamento em condições aeróbicas.

ERO tem efeito duplo sobre a função dos espermatozoides, em concentrações baixas, induzem processos básicos, como a capacitação e hiperativação (FORD, 2004, DE LAMIRANDE & GAGNON, 1993), contudo em quantidades excessivas, diminuem a motilidade dos espermatozoides, inibem a

fusão espermatozoide-oócito e induzem danos ao DNA (AITKEN et al., 1989; LOPES et al., 1998; GUTHRIE & WELCH, 2006). Isto demonstra que o controle da qualidade dessas espécies deve acontecer de forma bastante rígida, para o sucesso do processo de fertilização e preservação de estruturas membranosas, protéicas e lipídicas (RIBEIRO et al., 2005).

O balanço dos íons minerais nos fluidos corporais e no interior das estruturas celulares é um dos responsáveis por regular o metabolismo de diversas enzimas, manter o equilíbrio ácido-básico e a pressão osmótica, além de facilitar a transferência pela membrana plasmática de compostos essenciais (GIOJALAS et al., 1998). Nos eventos reprodutivos, a regulação dos transportadores de íons e canais, mantendo a concentração dos mesmos em um balance iônico estável, é fundamental para assegurar que o espermatozoide mantenha suas atividades necessárias e preparar-se para a fertilização, uma vez que o balanço iônico auxilia nos eventos de capacitação espermática e reação acrossomal (MARTÍNEZ-LÓPEZ et al., 2009)

Cada espécie animal, possui particularidades quanto às características da célula espermática, que acabam diferenciando sua funcionalidade das demais. A falta de conhecimento fisiológico associado aos eventos reprodutivos para a espécie suína impede muitas vezes a transposição de protocolos já fixados para outras espécies em diversos procedimentos, explicando os maus resultados obtidos até então ao redor do mundo em biotécnicas de produção *in vitro* de embriões e criopreservação de sêmen suíno, quando comparado com outras espécies (TRZCIŃSKA et al., 2011; MEN et al., 2013; TOMÁS et al., 2014).

Neste contexto, torna-se necessária a compreensão da morfofisiologia do espermatozoide suíno, visto que essa espécie, recentemente se tornou relevante como modelo animal, para investigação biomédica e para xenotransplantação (KIRK, 2003). Essa relevância no âmbito da pesquisa se deve ao seu recente mapeamento genético, o qual demonstrou a grande similaridade de seu genoma com o da espécie humana, possuindo ambas as espécies variantes genéticas relacionadas com as patologias de Alzheimer, diabetes, dislexia, obesidade e Mal de Parkinson, além de sua semelhança anatômica e fisiológica com o homem (GROENEN et al. 2012).

Desta forma, compreender a célula espermática, no que diz respeito às suas características estruturais e funcionais relacionadas ao processo de fertilização é crucial para agregar conhecimento que direcione estudos e métodos, visando compreender e melhorar a reprodução desses animais, além de permitir o uso da espécie como modelo animal e a preservação de seu germoplasma.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A célula espermática

O espermatozoide é o principal estrutura dentre os constituintes seminiais, caracteriza-se por ser uma célula com mobilidade ativa, capaz de migrar livremente até o encontro com o gameta feminino, sendo de suma importância para a fertilidade dos indivíduos, pois em sua cabeça está contido o material genético do progenitor masculino (seja ele portador do cromossomo X ou Y) (RUSSEL et al., 1990).

O espermatozoide de mamíferos é um exemplo de célula altamente particularizada, possuindo uma membrana plasmática compartimentada, além de serem únicos quanto a sua forma. Possuem duas regiões altamente especializadas - cabeça, local onde está contido o DNA e o acrossoma – fundamental para interação oócito-espermatozoide. Sua mobilidade é determinada pelo flagelo, e na região da peça intermediária qual estão contidas as mitocôndrias, organelas relacionadas com a produção de energia para o movimento celular (YANAGIMACHI, 1994; CHRISTOVAN et al., 2004).

A formação dos espermatozoides ocorre nos túbulos seminíferos (epitélio seminífero) envolvidos pelas células de Sertoli (BARTH & OKO, 1989) no testículo dos mais diversos animais. Essas células quando maduras, são células em diferenciação terminal, não passando por outras divisões ou diferenciações.

A espermatogênese, ou seja, processo de formação das células espermáticas ocorre em três etapas distintas (Fig. 1) (RUSSEL et al., 1990):

1. Fase proliferativa ou de multiplicação – fase em que as espermatogônias, ainda constituindo uma célula primária diploide ($2n$), começa o processo de repetidas divisões mitóticas;
2. Fase de crescimento – etapa em que ocorre um pequeno aumento de volume citoplasmático, convertendo as espermatogônias em espermatócitos primários, ainda diploides;
3. Fase de maturação – Etapa na qual ocorre a recombinação do material genético do espermatócito I e a primeira divisão meiótica, originando

dois espermatócitos secundários, haploides e com cromossomos duplicados, para cada espermatócito I. Nesta fase também ocorre, a segunda divisão meiótica, e a segregação cromossômica, originando a partir dos dois espermatócitos II, quatro células haplóide redondas, chamadas de espermátides;

4. Fase de diferenciação – Fase em que a espermátide sofre a diferenciação que dará origem a espermátides alongadas, de núcleo condensado e flagelo espécie-específico, conhecidos como espermatozoides.

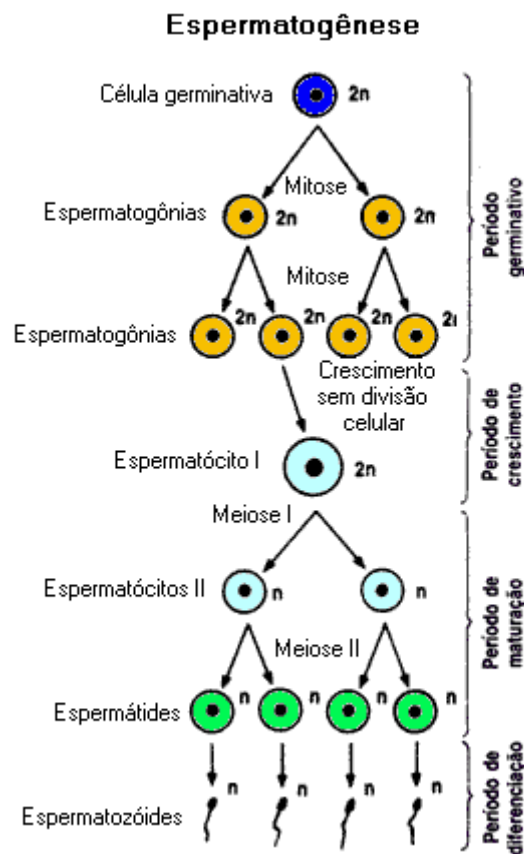


Figura 1: Etapas da espermatogênese. Imagem disponível em <<http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Citologia2/nucleo15.php>>

A grande maioria dos constituintes necessários para o metabolismo espermático é sintetizada durante a espermatogênese (AMANN & GRAHAM,

1992). Como por exemplo, durante a fase espermiogênica, ocorre a formação do complexo de Golgi, da cabeça e do acrossoma (KNOLBIL & NEIL, 2005).

Mas processos energéticos e algumas modificações funcionais são realizados pelos espermatozoides já maturados (BRINSKO, 1999). Desta forma essas células são capazes de efetuar trocas metabólicas com o meio no qual se encontram e essas trocas são facilitadas pelo caráter filiforme do espermatozoide, o qual lhe confere grande permeabilidade (MIES FILHO, 1987).

Assim, as estruturas formadas durante a espermatogênese (NISHIMUNE & OKABE, 1993) e algumas modificações estruturais posteriores (BANKS, 1992), preparam os espermatozoides para adquirir características morfofuncionais, como a motilidade progressiva, capacitação, reação acrossômica- conferindo habilidade de encontro, ligação e penetração no oócito resultando no desenvolvimento embrionário (JONES, 1998). Portanto, quaisquer alterações neste processo, que inviabilizem a modificação morfologia e/ou fisiológica, ou que estas aconteçam de forma errônea, leva a prejuízos na capacidade de fertilização.

Estruturas celulares e sua importância

Membrana celular

Células procariontes e eucariontes possuem uma membrana plasmática (MP) que circunda e define sua delimitação celular. Esta separa seu ambiente interno do ambiente externo, permitindo alterações em sua composição intracelular, de forma seletiva. E através dessas modificações é possível que está desempenhe inúmeros papéis fundamentais para os mais diversos fenômenos celulares (SINGER & NICOLSON, 1972; COOPER, 1996).

A membrana plasmática do espermatozoide é similar às outras membranas celulares, composta por uma dupla camada lipídica estruturada em um modelo chamado de “mosaico fluido” (Fig. 2). O termo mosaico fluido foi desenvolvido para caracterizar o mosaicismo de proteínas e lipídios, acompanhados de moléculas de colesterol, que permitem que as moléculas

lipídicas difundam-se rapidamente no plano da dupla camada, assim como as proteínas, a menos que sejam ancoradas por interações específicas (STRYER, 1996; HEIDEMANN, 1999).

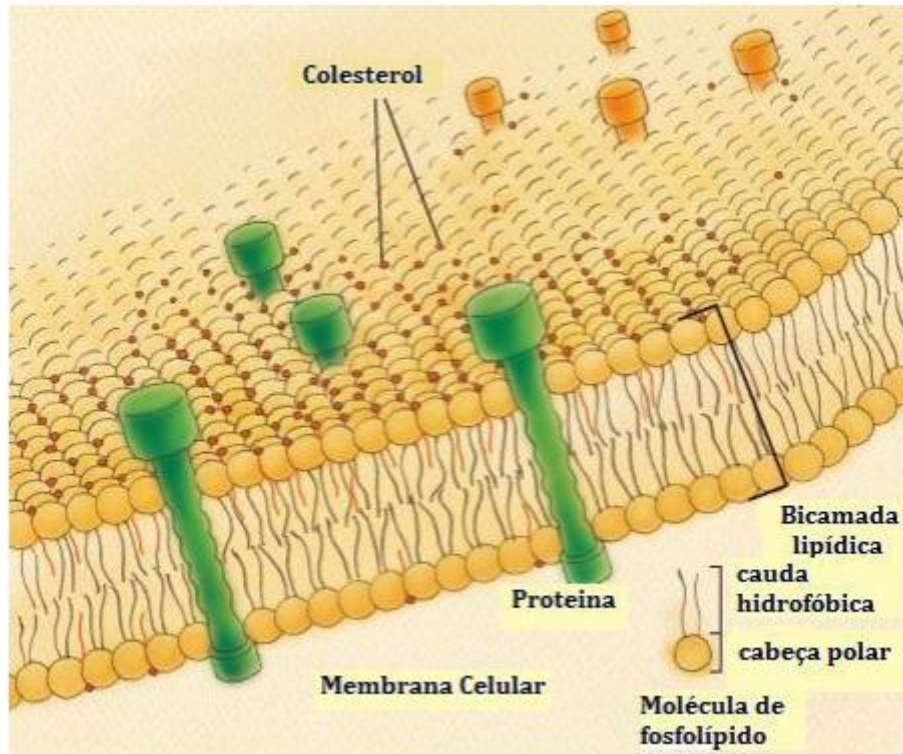


Figura 2: Ilustração da membrana plasmática. Adaptado do site <http://www.rikenresearch.riken.jp/images/figures/hi_3784.jpg>

As propriedades biológicas e biofísicas das membranas celulares, incluindo a membrana espermática, são determinadas pela sua composição molecular. Essa composição é especialmente interessante em procedimentos laboratoriais que visam a reprodução animal, pois exerce influência na fusão da membrana espermática com o oócito durante a fertilização e nas mudanças físicas que ocorrem na mesma durante a capacitação espermática, por exemplo (PARKS & GRAHAM, 1992).

Os fosfolípidos, lípidos que contém ácido fosfórico como mono ou diéster, constituem cerca de 50% da massa das membranas plasmáticas (WATSON, 1981). Os glicolípidos são encontrados exclusivamente no folheto externo da MP, constituindo aproximadamente 2% dos lípidos totais da

membrana (COOPER, 1996). Já o colesterol, entretanto, está presente em grande quantidade na membrana, em quantidade molar similares aos fosfolípidios, na maioria dos casos (COOPER, 1996).

A quantidade de colesterol encontrada na membrana espermática varia entre seus domínios, entre as espécies animais e entre indivíduos da mesma espécie. O colesterol tem importante papel na regulação da estabilidade e da permeabilidade da MP, sendo que o efluxo de colesterol da MP dos espermatozoides é o primeiro passo para o início do processo de capacitação (SEKI et al., 1992).

A MP representa importante papel na capacidade fertilizante dos espermatozoides, sendo capaz de se modificar ao longo do processo de espermatogênese, trânsito e armazenagem no epidídimo, ejaculação, depósito no trato genital feminino e, finalmente, capacitação e penetração do oócito (LENZI et al., 1996).

Durante o processo de capacitação ocorre a remoção e/ou importantes alterações de substâncias que estabilizam a membrana plasmática do espermatozoide. Um exemplo dessas modificações, pode-se destacar modificações da fluidez da MP, de concentração de Ca^{2+} , do pH, da adenosina-monofosfato cíclica (cAMP) e fosforilação da proteína tirosina (PONS-REJRAJI et al., 2009).

A capacitação, portanto, inicia o processo de desestabilização da MP (TRAVIS & KOPF, 2002), levando a uma maior desordem de seus componentes (translocação dos fosfolípidios na bicamada lipídica), tornando o espermatozoide apto a se ligar à zona pelúcida do oócito.

O espermatozoide suíno possui particularidades quanto a sua membrana plasmática, devido à grande concentração de ácidos graxos poliinsaturados nos fosfolípidios - 30% de docosahexanoico e 25% de docosapentaenoico (CEROLINI et al., 2000), com poucas ligações duplas do tipo *cis*. Além disso, possui uma maior quantidade de colesterol na monocamada interna em relação à monocamada externa, e uma quantidade menor de fosfatidilcolina e uma quantidade maior de fosfatidiletanolamina e esfingomielina quando comparada com a composição de MP de outras espécies (CEROLINI et al., 2000; JOHNSON et al., 2000), fato que faz com que durante alguns bioprocessos, como produção *in vitro* de embriões e

criopreservação espermática, aumente significativamente sua sensibilidade a ação de ERO.

Um dos componentes presentes nessa estrutura e de suma importância é o colesterol. Em espermatozoides suínos, a MP já possui uma menor porcentagem de moléculas de colesterol com relação aos fosfolípidios em comparação com outras espécies animais, distribuídas de forma assimétrica, e com maior disposição na monocamada interna (PAULENZ et al., 1999; JOHNSON et al., 2000). Durante o processo de capacitação, dada uma série de eventos moleculares, ainda ocorre um efluxo de colesterol, capaz de aumentar a desordem da porção dos fosfolípidios, resultando em um acréscimo da permeabilidade da bicamada lipídica (BUFFONE et al., 2005; BREIBART et al., 2005; THOMAS et al., 2006).

Acrossoma

O acrossoma pode ser caracterizado com uma dupla membrana – interna e externa, localizado sobre o núcleo, na porção anterior da célula espermática de várias espécies (BARTH & OKO, 1989). Contém um diversificado grupo de proteínas que serão fundamentais para a interação entre o espermatozoide e a zona pelúcida do oócito e posterior fertilização.

Quando o espermatozoide encontra o oócito, este se liga a proteínas específicas chamadas de ZP3 presentes no gameta feminino. Esta ligação irá desencadear eventos para que ocorra a reação acrossomal (Fig. 3), na qual a membrana externa do acrossoma funde-se com a membrana plasmática, dado um aumento das concentrações de Ca^{2+} , do pH e da produção de substâncias fusogênicas (SILVA, 1998).

A membrana acrossomal interna e o segmento equatorial persistem até a fusão do espermatozoide com o oócito (FLESCH & GADELLA, 2000). Somente o espermatozoide que passa corretamente pelo processo de capacitação e reação do acrossoma, sofrendo todas as alterações funcionais e estruturais, torna-se apto a fecundar o oócito (GADELLA et al., 2001; AREEKIJSEREE & VEERAPRADITSIN, 2007).

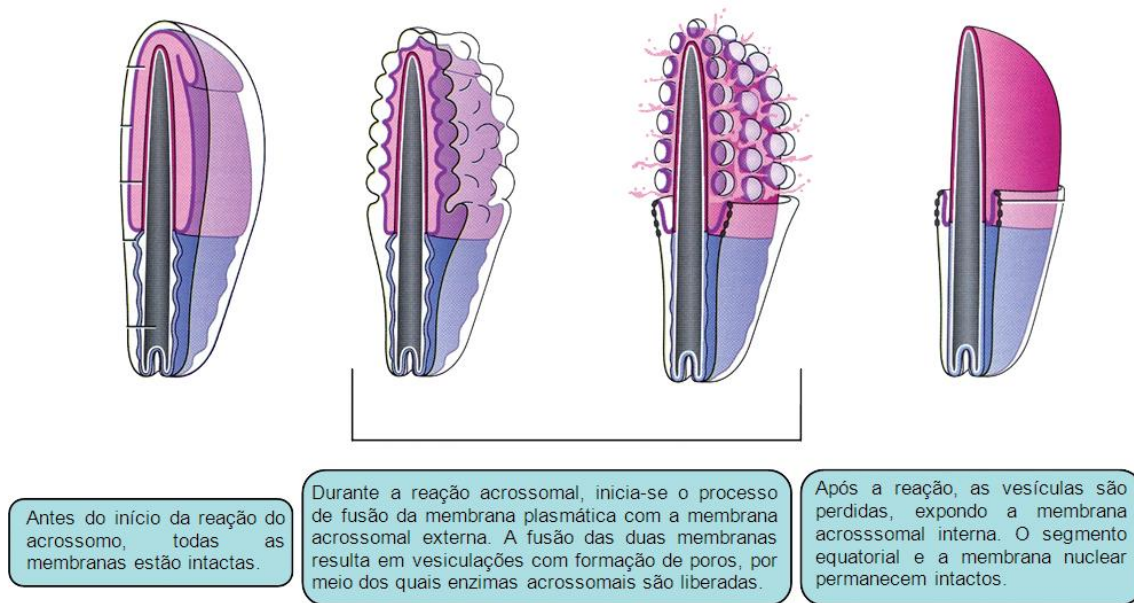


Figura 3. Modelo ilustrativo da reação acrossômica (Adaptado de SENGER, 2003).

Mitocôndria

A mitocôndria é uma organela presente em todas as células eucariontes e constitui um exemplo de interação morfofuncional, uma vez que localizada nas regiões celulares onde a demanda energética é maior, participando nas reações que transferem energia, depositada nas fontes calóricas para a molécula de adenosina trifosfato (ATP) (DE ROBERTIS & HIB, 2001). No caso dos espermatozoides, elas estão localizadas em sua peça intermediária, fornecendo energia para a motilidade espermática, hiperativação e penetração do espermatozoide ao oócito (ALBERTS et al., 1999).

A energia proveniente das ligações químicas dos substratos energéticos contidos no meio é transferida para as coenzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) e a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) através de um conjunto de processos, como a glicólise e o Ciclo de Krebs (CONNELL et al., 2002; SILVA e GADELLA, 2006). Através dessas coenzimas na forma reduzida a mitocôndria obtém elétrons, sendo capaz de transferir a uma molécula de adenosina difosfato (ADP) um fosfato inorgânico, levando a formação do ATP – moeda energética, pelo processo de fosforilação oxidativa.

Entretanto, diferenças na funcionalidade mitocondrial é relacionada com alguns problemas referentes à reprodução. Em humanos há evidências da

correlação entra a baixa funcionalidade mitocondrial, com a diminuição da motilidade espermática e conseqüentemente com redução da fertilidade (GRAHAM, 2001; MARCHETTI et al., 2004).

Outro problema relacionado a funcionalidade de mitocôndria seria o estresse oxidativo e a formação das ERO, não balanceado pelos mecanismos de defesa do organismo (ONG et al., 2002). O estresse oxidativo é considerado como uma das causas mais frequentes da disfunção espermática (AITKEN et al., 1998), principalmente relacionado a manipulação seminal em biotécnicas. Os radicais livres são produzidos tanto por espermatozoides normais quanto por anormais, entretanto os normais possuem mecanismos de defesa que previnem parte do dano celular (SULEIMAN et al., 1996), como uma aumento da capacidade antioxidante total.

Estresse oxidativo e a oxidação de moléculas biológicas: Lipídeos, proteínas e DNA

No contexto do estresse oxidativo, devido às características da membrana, como a de conter grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados e menor quantidade de colesterol, além de eventos como a alteração da fluidez de membrana, para a capacitação, fazem com que o espermatozoide seja mais propenso ao ataque de ERO (PAULENZ et al., 1999; JOHNSON et al., 2000; CEROLINI et al., 2000; TRAVIS & KOPF, 2002).

A produção e o ataque de ERO ocorre em forma de cascata, sendo um pequeno evento capaz de desencadear outros, de proporção crescente (SHAMI & MOREIRA, 2004). Uma vez que a presença de um ou mais elétrons desemparelhados, nos orbitais externos, determina às moléculas um campo magnético altamente reativo, passando a reagir com qualquer composto situado próximo a sua orbita e determinando uma função oxidante (YU, 1994).

ERO tem efeito duplo sobre a função dos espermatozoides, em concentrações baixas, induz processos básicos como a capacitação e hiperativação (FORD, 2004; DE LAMIRANDE & GAGNON, 1993), contudo em quantidades excessivas, diminui a motilidade dos espermatozoides (GUTHRIE & WELCH, 2006) e inibe a fusão espermatozoide-oócito (AITKEN et al., 1989). Quando formadas em excesso, essas espécies reativas tem o potencial de

oxidar moléculas biológicas de grande importância, como lipídeos, proteínas e DNA.

Um dos efeitos prejudiciais a essas estruturas é a promoção da lipoperoxidação, ou seja, peroxidação dos constituintes da bicamada lipídica das membranas. Este evento é capaz de alterar a fluidez de membrana, prejudicando os eventos pós-maturação, além da liberação de subprodutos tóxicos (KARADAS & SURAI, 2004).

Num segundo momento, os ERO irão causar a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c) (STEINBRECHER et al., 1990), levando a inativação funcional das mesmas, além de modificar o transporte iônico e alterar a atividade de diversas enzimas (KARADAS & SURAI, 2004). E por fim, num estágio de dano oxidativo crítico, ocorre-la também a interação com moléculas de DNA e RNA, desencadeando mutações somáticas e problemas de transcrição (FIRMO et al. 2004).

Desta forma, fica demonstrado que a concentração de ERO deve ser controlada de forma rígida de acordo com o estado fisiológico da célula, para que ocorra um equilíbrio entre a produção de ERO excessiva, capaz de prejudicar as estruturas e a fisiologia da célula espermática, e a concentração necessária para as ERO atuarem positivamente nos eventos reprodutivos agindo, por exemplo, como sinalizadores. Assim o sistema antioxidante age na neutralização do excesso de ERO para o sucesso do processo da fertilização.

Balanço de íons

O balanço dos íons minerais nos fluidos corporais e nas células regula o metabolismo de diversas enzimas, mantém o equilíbrio ácido-básico e a pressão osmótica, além de facilitar a transferência de compostos essenciais pela membrana plasmática (GIOJALAS et al., 1998). Nos eventos reprodutivos, a regulação dos transportadores de íons e canais, mantendo a concentração dos mesmos em um balanço iônico estável, é fundamental para segurar que o espermatozoide mantenha suas atividades necessárias e para preparar essa célula para fertilização (MARTÍNEZ-LÓPEZ et al., 2009).

A concentração iônica intracelular, muda ao longo da migração do espermatozoide no trato reprodutivo feminino, dada uma proporção distinta das

concentrações, principalmente de sódio (Na^+) e potássio (K^+) durante o processo de migração. Essas modificações iônicas possibilitam a ativação de canais iônicos específicos, que são despolarizados e culminam na hiperpolarização do espermatozoide (MARTÍNEZ-LÓPEZ et al., 2009).

A mudança da concentração de K^+ , determina mudanças no potencial de membrana dos espermatozoides (NAVARRO et al., 2007) e em resposta é aumentada a força motriz para a permeabilidade de cálcio (Ca^{2+}) via canais específicos para este íon. Um aumento de Ca^{2+} intracelular, principalmente na peça intermediária da célula espermática (KIRICHOK et al., 2006), induz processos dependentes desse íons (KIRICHOK et al., 2006; QI et al., 2007), como a capacitação espermática e motilidade.

Além disso, também ocorre a participação dos íons magnésio, que também contribuem significativamente na composição iônica do plasma seminal e da célula espermática, e suas concentrações, assim como a dos íons acima citados, variam entre ejaculados e espécies (CIERESZKO et al., 2000).

Estes conjuntos de íons são, portanto, muito importantes na regulação de diversos eventos celulares como motilidade espermática e ativação espermática. Além disso, esse balanço iônico dá a essa célula a capacidade de manter seu volume celular através de um mecanismo especial, conhecido como: diminuição do volume de regulação (RVD) (ZENG et al., 2011), principalmente pelos canais Slo3.

Desta forma, a relação entre os íons e a composição iônica celular podem influenciar em diversos eventos, como na fertilidade, sendo esta relação na maioria dos casos espécie-específica e animal-específico, devido a fatores como o meio ambiente e época de reprodução.

III. OBJETIVO

Objetivo geral

Identificar o perfil morfofuncional de espermatozoides suínos e relacionar com a fertilidade *in vivo*.

Objetivos específicos

1. Identificar o perfil estrutural e funcional das células espermáticas suínas;
2. Analisar modificações morfofuncionais na integridade de membrana plasmática, fluidez de membrana plasmática, reação de acrossoma, quantidade de espécies reativas de oxigênio, motilidade espermática, funcionalidade mitocondrial, capacidade antioxidante total em espermatozoides de alta e baixa fertilidade;
3. Analisar possíveis danos oxidativos, através da avaliação da integridade de DNA, carboxilação de proteínas, e lipoperoxidação em espermatozoide de alta e baixa fertilidade.
4. Analisar a concentração dos íons potássio, cálcio, sódio e magnésio em células de animais de alta e baixa fertilidade
5. Analisar a sensibilidade do teste de penetração *in vitro* e número de espermatozoides por oócitos com a fertilidade *in vivo* dos animais.
6. Identificar possíveis marcadores morfofuncionais para determinar o potencial fertilizante de amostras seminais suínas.

IV. DESENHO EXPERIMENTAL

Foi realizada uma análise retrospectiva de no mínimo 76 fêmeas/macho, através de um banco de dados contendo as taxas de parição, da capacidade fertilizante de diferentes machos de fertilidade comprovada. A partir desse resultado, um total de 20 animais foi dividido em dois grupos: animais de alta fertilidade (70% ou acima) e animais de baixa fertilidade (abaixo de 70%). Amostras de sêmen, referentes a esses animais, foram analisadas quanto aos aspectos morfofisiológico e relaciona-los à fertilidade *in vivo* e *in vitro* (através do teste de penetração em oócitos homólogos), como pode ser visualizada na Figura 4.

POPULAÇÃO COMERCIAL DE SUÍNOS LANDRACE

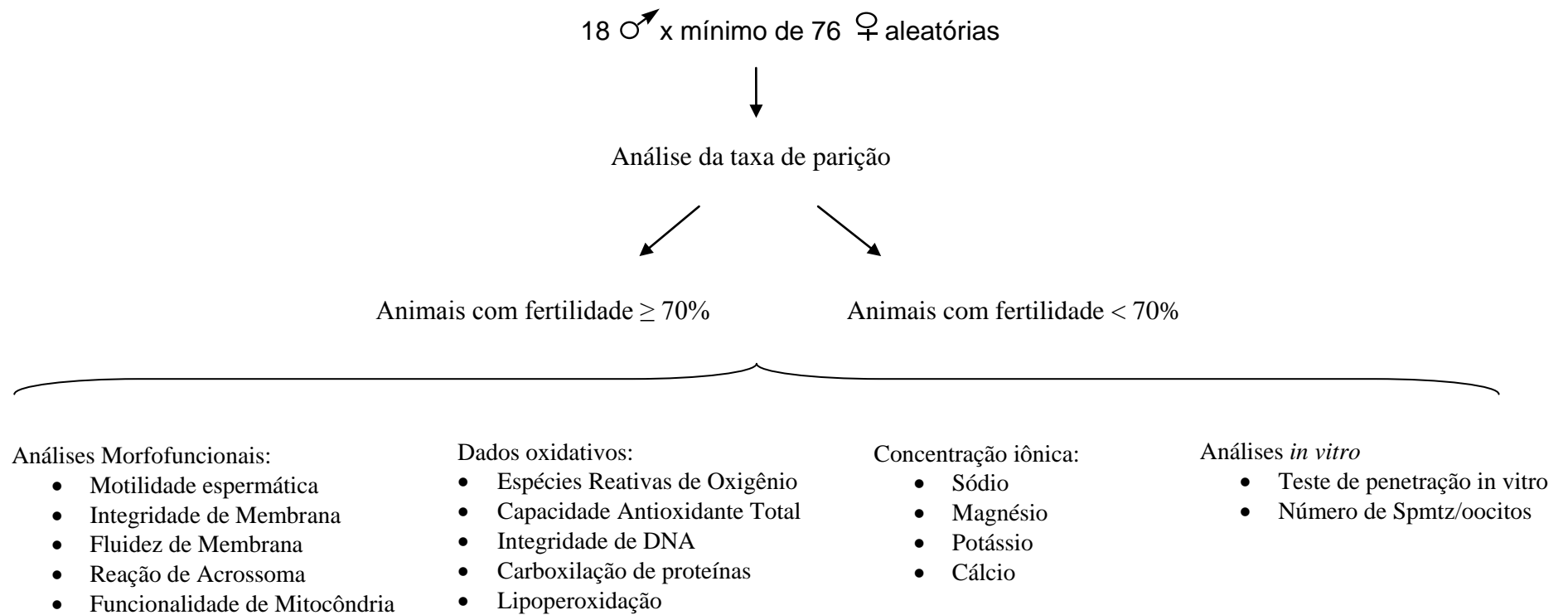


Figura 4: Desenho experimental

V. ARTIGO

A ser submetido para a revista *Reproduction*

MORPHOFUNCTIONAL ANALYSIS IN SPERMATOZOA SWINE AND ITS
RELATIONSHIP WITH FERTILITY *IN VIVO*

Tainã F. Cardoso¹, Estela F. Silva², Antonio Sergio Varela Jr.³, Marianna B.

Jorge³, Adalto Bianchini³, Carine D. Corcini⁴

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brasil. E-mail address: tainaacardoso@hotmail.com

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brasil.

³ Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brasil.

⁴ ReproPel, Faculdade de Veterinária, Campus Capão do Leão, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil.

ABSTRACT

The spermatozoa is one of the seminal constituents, being essential to the fertility of individuals, since it is contained genetic material from the male parent, carrying it through the female reproductive tract to find the oocyte. Regarding the swine sperm cell, there are few reports about its peculiarities, mainly listing the factors that can interfere in the fertility of these animals. Due to the increasing importance of specie such as biological model and its significance in the commercial production, it is necessary to understand the spermatozoa with respect it is the structure and function, related to the fertilization process characteristics. Thus, the present study evaluated the morphophysiology of swine spermatozoa of high and low fertility *in vivo*. Animals with high fertility has mitochondrial functionality greater ($p < 0.05$), fluidity plasma membrane lower ($p < 0.01$) and total antioxidant capacity greater ($p < 0.01$). These last being positively correlated with fertility *in vivo*, $r = 0.77$, $p = 0.0003$ and $r = 0.63$, $p = 0.0049$, respectively. Thus, this study showed some characteristics of porcine sperm cells and factors that can affect the fertility of animals, such as the fluidity of plasma membrane, total antioxidant capacity and mitochondrial functionality of spermatozoids that can be used as biochemical markers to predict the *in vivo* fertility in swine.

INTRODUCTION

The spermatozoa is main of the seminal constituents, being essential for fertility of individuals, since it contains the genetic material from the male parent, carrying through the female reproductive tract until the encounter with the

oocyte (Russell *et al.*, 1990). The swine sperm cell is very particular about its structure and physiology, and there are few reports describing these factors, especially listing them and relating them with the ability to interfere with the fertility of these animals.

Until now, the fertility of an animal was determined through a traditional semen analysis, considering parameters such as motility, sperm concentration and morphology (Melo *et al.*, 2005). However, the fertility is a complex and multifactorial phenomenon, especially when it involves animals of fertility and prolificacy proven, whose physiological differences are poorly understood (Xu *et al.*, 1998).

The characteristics required a spermatozoa to obtain success in the interaction with the female reproductive tract, sperm-oocyte binding and fertilization, involves the oxidative state, the concentration of ions and cell parameters, such as integrity and fluidity of cell membrane, and acrossomal reaction (Rodriguez-Martinez *et al.*, 1998; Gadella *et al.*, 2001; Birck *et al.*, 2010). In addition, these factors are good indicators about the physiological state of the spermatozoa and they can provide valuable information as to the fertilizing power of a male.

The basal physiological knowledge of swine spermatozoa still features numerous gaps, which becomes a major obstacle to improving of scientific techniques for the multiplication of these animals. Especially animals of high genetic, and with use as biological resource (Antunes, 2007), as pointed out by several studies with results far less expressive than when it is compared to other species (Watson, 2000; De Ambrogi *et al.*, 2006).

Then, it is crucial to aggregate knowledge, understand the structural and functional characteristics of the swine spermatozoa and relates them to the fertilization process. These studies could be directed to optimize methods improving the reproduction of these animals, and, also it can allow the use of swine specie as animal model and the preservation its germplasm. Therefore, this study aimed to identify the profile morphofunctional of swine spermatozoa and relate it with fertility in vivo.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Design

A retrospective analysis of at least 76 female per male was performed through a database containing given birth rate, determining thus the fertilizing ability of different swine males with proven fertility. From the distribution of fertility, were formed two groups: animals of high fertility (70% or above) and animals of low fertility (below 70%). Were analyzed the semen sample, referring to these animals, for morphophysiological and related the aspects as fertility in vivo and in vitro (through penetration testing in homologous oocytes). All chemical reagents used in this experiment were purchased from Sigma Aldrich (Saint Louis, MO).

Collecting material

This study sent a notification of the use of biological material from vertebrate to the Ethics Committee for Animal Use (CEUA) of the Federal University Rio Grande.

Landrace males swine of proven fertility in collection routine in a commercial artificial insemination center (longitude 51 ° 57'59 "and latitude 29 °

30 '07") were collected. All animals were handled under the same environmental and sanitary conditions, being fed twice daily. The samples were collected by the gloved hand method.

Processing of ejaculate

Immediately after collection, the semen was diluted in isothermal conditions (1:1 v/v) in the diluent Beltsville Thawing Solution (BTS), as Pursel & Johnson (1975). Subsequently, the samples were forwarded, under controlled temperature for Laboratory of Animal reproduction - School of Veterinary Medicine, Federal University of Pelotas (Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brazil), for further processing . The fresh semen was evaluated for sperm motility, and only samples that showed motility with more than 70 % were evaluated in relation to other parameters: plasma membrane integrity, fluidity of plasma membrane, acrosome reaction, mitochondrial functionality, integrity DNA, reactive oxygen species , and performed the *in vitro* penetration test. For other evaluations (total antioxidant capacity, intracellular ionic balance, lipid peroxidation and protein carboxylation), an aliquot of each sample for further analysis were stored at -20 ° C.

Sperm motility

For analysis of sperm motility, an aliquot of 20µl semen was evaluated with visual optical microscopy with heated 400x magnification by a single trained examiner, under slide and coverslip, both previously heated to 37 °C (CBRA 1998).

Analysis in the flow cytometer

DNA Integrity

The DNA integrity of spermatozoa was determined using the properties of probe metachromatic acridine orange in assay sperm chromatin structure (SCSA1) (Evenson *et al.* 1994).

Membrane Integrity

The integrity of plasma membrane was analyzed by permeabilization process by combination of PI (propidium iodide – 7.3 $\mu\text{M/L}$) and DCF (carboxyfluorescein diacetate - 20 $\mu\text{M/L}$). The working solution used for staining of semen contained phosphate buffered saline (PBS), Hoechst 33342 (16.2 $\mu\text{M/L}$), CFDA and IP. Sperm cells were classified as normal / not damaged (DCF+/-IP), and nonviable/dead (DCF+/+IP; DCF-/IP+; DCF-/IP-) (Gillan *et al.*, 2005; Fernández-Gago *et al.*, 2013).

Fluidity of plasma membrane

For this evaluation was used the hydrophobic fluorescent dye, merocyanine 540 (M540) which binds preferentially with lipid membranes loosely bound due to increased permeability of the plasma membrane. The samples were prepared in PBS with M540 (2.7 mM/L) and Hoechst 33342 (16.2 $\mu\text{M/L}$). Cells were sorted for high fluorescence and low fluorescence (Muratori *et al.*, 2004; Fernández-Gago *et al.*, 2013).

Acrosome reaction

The acrosome reaction was estimated using agglutinin lectin *Arachis hypogaea* (PNA) coupled with fluorescein isothiocyanate (FITC). The samples were prepared in PBS with 0.04 M/L of PNA - FITC and Hoechst 33342 (16.2

$\mu\text{M/L}$) (Petrunkina et al., 2005). Sperm were classified as cells with unreacted acrosome (PNA-/IP-) and cell with acrosome reacted (PNA+/IP- ; PNA-/IP+ and PNA+/IP+).

Mitochondrial functionality

Was evaluated the mitochondrial functionality of spermatozoa using Rhodamine 123. This dye is easily sequestered in mitochondria and emits intense green fluorescence in active mitochondria (mitochondrial membrane with potential higher). The samples were prepared in PBS with 13 $\mu\text{M/L}$ Rhodamine 123 and Hoechst 33342 (16.2 $\mu\text{M/L}$) (Gillan *et al.* 2005).

Concentration of Intracellular Reactive Oxygen Species (ROS)

This assessment occurred through 2'7 'dichlorofluorescein diacetate (H_2DCFDA), which is used for the detection of intracellular ROS. H_2DCFDA is oxidized to dichlorofluorescein (DCF), which emits fluorescence at 530 nm in response to excitation of 488 - nm. The samples were prepared in PBS with 1 mM/L H_2DCFDA and Hoechst 33342 (16.2 $\mu\text{M/L}$) (Domínguez-Rebolledo *et al.*, 2011). The median fluorescence intensity of green was used for the analysis.

Configuration for Flow Cytometry

The flow cytometry analyzes were performed on an Attune Acoustic Focusing® (Life Technologies) with blue (488 nm) and violet (405 nm) lasers. For detection of cell populations in all analysis, cells were stained with Hoechst 33342 and the population was detected by the photomultiplier tube (PMT) VL1 (450/40 nm) (Nagy *et al.*, 2003). The green fluorescence of FITC, H_2DCFDA , Rhodamine 123, carboxyfluorescein and metachromatic probe acridine orange was read with BL1 photodetector (filter 530/30). The orange fluorescence from

the merocyanine 549 metachromatic probe acridine orange was read with the photodetector BL2 Filter (574/26). The red fluorescence of PI was read with photodetector BL3 (640LP filter). Fluorescence data were in log scale. Attune® Cytometer software version 2.1.0 (Life Technologies) for the interpretation of the data was used. Ten thousand events were collected per sample at a flow rate of 200 cells/second using forward and side light scatter to exclude debris and aggregates and analysis. Non- spermatozoa events (debris) were eliminated based on scatter plots (Petrunkina et al, 2005; Piehler et al., 2005)

Oocyte penetration test

For analysis of in vitro fertility were used oocytes from ovaries of prepubertal nuts collected in a local refrigerator. Ovaries were placed in an isothermal bottle and transported to the laboratory, being punctured with the aid of a vacuum device (Aspire Max). The material was frozen at -20 °C. Were visualized, subsequently in epifluorescence microscope in violet light. The number of spermatozoa per oocyte and the number of penetrated oocytes (penetration rate *in vitro*) was assessed second Corcini et al. (2012).

Total antioxidant capacity

The total antioxidant capacity against peroxide radicals generated by thermal decomposition at 36 °C, 2,2'- azobis (2- metilpropionamidina) dihydrochloride (ABAP) was measured second Amado et al. (2009). Was measured the fluorescence using excitation wavelengths of 488 nm and an emission wavelength of 529 nm.

Lipid peroxidation

The extent of lipid peroxidation was measured by quantification of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) according to the protocol described Oakes and Van Der Kraak, 2003. The content of TBARS was expressed as equivalents of malondialdehyde (MDA) in the sample to a cell concentration of $3 \cdot 10^6$ sperm/mL. Was measured the fluorescence with emission at 553 nm after excitation at 515nm.

Peroxidation of protein carbonyl

This assessment measures the oxidative damage to proteins, through the carbonyl compounds. Samples were diluted to a concentration of $1 \cdot 10^7$ cells/ml and the protocol was developed according to Levine et al. (1990). The extent of damage was done by absorbance reading at 370 nm. Were expressed results as nmol cabonil/ 10^7 cell.

Intracellular ionic concentration

The concentrations of ions of calcium, magnesium, potassium and sodium were measured by Atomic Absorption Spectroscopy Flame (AAS 932 Plus, GBC, Hampshire, IL, USA) as described previously (Bianchini *et al* , 2003; Pinho *et al.*, 2007; Paganini & Bianchini, 2009; Lopes et al, 2011a,b).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the Shapiro-Wilk test for analysis of normality and homogeneity of variance for all dependent variables. After, for the dependent variables with normal distribution, it was performed analysis of variance by ANOVA with subsequent comparison between means using Tukey's test. It were analyzed the variables that were not normally

distributed by Wilcoxon variance averages. Correlation analysis for parametric variables were analyzed using Pearson's correlation test and the nonparametric was correlation using Spearman test. All analyzes were performed Statistix 9.0 software.

RESULTS

In vivo fertility rates of animals showed a curve with the formation of two distinct groups (fig. 1). The animals have been divided into two groups based in this curve. The animals were divided into animals with high fertility and low fertility rate animals, taking into account the rate of 70%. With regard to fertility *in vivo* groups formed, it was demonstrated a statistically significant difference ($P < 0.01$) (tab. 1).

The sperm penetration test in homologous oocytes has not been sensitive in identifying males of high and low fertility, since between the groups did not differ statistically (tab. 1)

Table 1: Data of *in vivo* fertility, *in vitro* penetration rate (PR), minimum and maximum values (MeM) and number of spermatozoa per oocyte (SPE) of Landrace pigs.

	<i>In vivo</i> fertility	MeM	PR	MeM	SPE
High fertility (n=9)	81.6 ± 1.9 ^A	74.0/91.9	63.5 ± 8.3	28.5/88.8	1.9 ± 0.5
Low fertility (n=9)	30.6 ± 4.9 ^B	4.1/48.8	63.1 ± 9.3	28.7/100.0	1.6 ± 0.4

Are expressed the results as % mean ± standard error to *In vivo* fertility, MeM and PR. Moreover, are expressed the results as mean ± standard error to SPE. Different letters in the same column differ significantly by Wilcoxon test. ($P < 0.01$).

Animals with high fertility rate showed samples with less fluidity plasma membrane ($P < 0.01$) (tab. 2). In addition, these animals showed greater mitochondrial functionality when compared with low fertility animals ($P < 0.05$) (tab. 2). Among other parameters, any significant difference was found to sperm motility, cell membrane integrity and acrossomal reaction between the groups (tab. 2).

Table 2: Data of sperm motility (MOT), plasma membrane integrity (PMI), less fluidity of plasma membrane (LFPM), acrosome reaction (ACR) and mitochondrial function (MIF) of the sperm cells of Landrace pigs of high and low Fertility (% Mean \pm SEM)

	MOT	PMI	LFPM	ACR	MIF
High fertility	72.2 \pm 3.2	66.8 \pm 9.2	37.4 \pm 6.5 ^A	20.5 \pm 3.6	46.7 \pm 9.7 ^A
Low fertility	73.3 \pm 2.3	50.6 \pm 10.9	21.0 \pm 2.6 ^B	25.2 \pm 3.7	18.3 \pm 4.1 ^B

Are expressed the results as mean percentage \pm standard error of the number of cell. Different letters in the same column differ significantly by Wilcoxon test. LFPM ($P < 0.01$); MIF ($P < 0.05$).

Regarding evaluations related to oxidative stress: reactive oxygen species and their damages generated to lipids, proteins (Carbonyl groups) and DNA there was no difference between groups of high and low fertility (tab. 3). About the total antioxidant capacity against peroxy radicals, high fertility animals showed a greater ability to neutralize these compounds ($P < 0.01$) (tab. 3).

Table 3: Data relating to the production of intracellular reactive species oxygen (ROS), total antioxidant capacity (ACAP), lipid peroxidation (LipPero), carboxylation of proteins (CarProt) and DNA integrity (DNAi) of sperm from the swine Landrace with high and low fertility.

	ROS	ACAP	LipPero	CarProt	DNAi
High fertility	45.6 ± 5.4	5.5x10 ⁺⁶ ± 2.8x10 ⁺⁵ ^A	1.1x10 ⁻² ± 1.8x10 ⁻³	1.5 ± 0.4	84.6 ± 4.2
Low fertility	41.9 ± 4.3	4.6x10 ⁺⁶ ± 1.8x10 ⁺⁵ ^B	1.2x10 ⁻² ± 1.6x10 ⁻³	1.2 ± 0.5	82.4 ± 3.4

Are expressed the results as mean ± SEM percentage for the IDNA number of cells for DNAi, mean ± SEM of median fluorescence for ROS, expressed as fluorescence per unit area for ACAP, mean ± SEM of nMol/10⁷ CarProt cells and mean ± SEM of nanomol equivalents cells TMP/3.10⁶ to LipPero. Different letters in the same column differ significantly by ANOVA. (P<0.01)

Ion concentrations already present in the cytosol of spermatozoa, did not show distinction about ionic balance between the groups (tab. 4).

Table 4: Data of ionic concentration, related to sodium (Na⁺), magnesium (Mg²⁺), potassium (K⁺) and calcium (Ca²⁺), the sperm cells of Landrace pigs of high and low fertility.

	Na ⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Ca ²⁺
High fertility	150.6 ± 26.5	1.6 ± 0.3	2.2 ± 0.3	36.4 ± 7.9
Low fertility	149.7 ± 28.5	1.5 ± 0.2	2.9 ± 0.5	39.8 ± 8.7

Are expressed the results as mean ± SEM of ion concentration per ug/ml

A positive correlation was found between total antioxidant capacity ($r = 0.63$; $p = 0.0049$) and the number of cells with less fluidly plasma membrane ($r = 0.77$; $p = 0.0003$) with fertility *in vivo* in animals, as seen in the figures 2A and 2B.

DISCUSSION

In vivo fertility rates animal belonging to commercial plantel presented the formation of two distinct groups, which demonstrated a statistically significant difference ($P < 0.01$) among themselves (tab. 1). High fertility animals showed a fertility rate of 74 to 91%. Thus, the fertility rate of 70% can be considered as a minimum value for selection of these animals, allowing to distinguish them when their fertilization more precisely.

The penetration sperm test into homologous oocytes, which can be used to prediction of fertility of males, did not demonstrate sensitivity in identifying males with different fertility rates. So *in vitro* penetration rates and number of sperm per oocyte using cooled semen 17°C for a maximum of 6h, were not able to predict fertility *in vivo* of swine in this study

Usually, analyses such as sperm motility are used for the different animal species, in order to obtain information about the status of the spermatogenesis and fertilization potential (CBRA, 1998). However, these tests are often insufficient and cannot assess the real ability of the spermatozoa fertilization (Correa *et al.*, 1997; Melo *et al.*, 2005), as demonstrated in table 2.

Recently, structural and functional assessments, in microscope have been employed to mark specific structures of cells, and many correlations with

fertility has been identified, although with many differences and a few related to swine (Rajender *et al.*, 2010; Novak *et al.*, 2010; Ménézo *et al.*, 2012).

In this study, animals with high fertility rate showed less fluidity plasma membrane ($P < 0.001$) (tab. 2), possibly demonstrating that, ejaculates of low fertility animals feature plasma membrane shows greater fluidity, although with integrity. This is a characteristic related to the process of sperm capacitation before the entry of the female reproductive tract (Senger, 2003). The increase in membrane fluidity due to the efflux of cholesterol from the plasma membrane is a physiological phenomenon that must occur in order chronologically and spatially controlled (Hurtado *et al.*, 2013). A dyssynchrony between this event and the fertilization, could interfere in selective permeability and other cellular events of the sperm, and can negatively affect the fertilising capacity and in the metabolism, as pointed out in this study through the low fertility rates in vivo for animals with greater membrane fluidity.

In addition, high fertility animals showed greater mitochondrial functionality when compared with low fertility animals ($P < 0.05$) (tab. 2). Some studies, have correlated the low mitochondrial function and the reduction of fertility (Graham, 2001; Marchetti *et al.*, 2004), since a reduction in mitochondrial function is related to a decrease in the metabolic state of the cell (Ly *et al.*, 2003), and this reduction is usually accompanied by the production of ROS, contributing to cell death (Kroemer *et al.*, 1997). However, in our study, it was not demonstrated an increased amount of ROS by cells of low fertility, thus, possibly the physiological difference responsible for increased rates of fertilization is provided by the increase in mitochondrial function associated with an increased cellular metabolism necessary for fertilization events.

Regarding evaluations related to oxidative stress, reactive oxygen species and its damage generated to lipids, proteins (Carbonyl groups) and DNA there was no difference between fertility groups (tab. 3). These results contradict some studies (Lanzafame *et al.*, 2009; Benedetti *et al.*, 2012; Agarwal *et al.*, 2014) that make inference with infertility animals, and oxidative stress in these cases one of the most frequently mentioned causes. However, for animals of proven fertility, such as those used in this work, and with associated genetic selection, these factors were not related, demonstrating that, in a first moment, the reactive oxygen species and their related damage are not responsible for the decline of fertility.

About the total antioxidant capacity against peroxy radicals, high fertility animals showed a greater power in neutralizing these compounds ($P < 0.01$) (tab. 3). This result corroborates with the hypothesis that the cells of high fertility have increased cellular metabolism, since they also have a higher mitochondrial activity. In this sense those gametes are achieving balance the ROS generated (Ferreira & Matsubara, 1997; Nordberg & Arnér, 2001).

Naturally, spermatozoa have a low antioxidant capacity, when compared to other cellular types, whereas during the process of spermatogenesis, these cells lose most of the cytoplasm during the terminal phase, and together they lose many antioxidant compounds (Hu *et al.*, 2009). So the cells with higher power fertilizer, possibly, maintained during the process, greater quantity of cytoplasmic component that can significantly reduce the adverse effects of ROS produced by the rapid metabolism.

Ion concentrations presents in the cytosol of sperm, it did not show a distinct ionic balance between groups (tab. 4). Ionic concentrations found in this

study are consistent with the literature, when compared with other species, especially the calcium and magnesium ions (Alberts *et al.*, 2004; Valsa *et al.*, 2012).

About sodium and potassium ions, their concentrations are controlled primarily through the Na⁺/K⁺-ATPase (Jimenez *et al.*, 2011) and there are some distinct results regarding the different species (Quinn *et al.*, 1965). However, our results are similar to other mammalian spermatozoa, including humans, having a higher intracellular concentration of sodium when compared to potassium (Quinn *et al.*, 1965; Akpa *et al.*, 2012).

This intracellular ionic balance, possibly, it is related to the degree of sperm motility and migration time, requiring a plasma membrane excitability, enabled by the entry of Na⁺ and K⁺ out of the cytosol. This increase of the frequency of the action potential is justified by the need to shift the cells of local of semen deposition, considering the anatomical characteristics of cervix and the uterine horns of the female swine, to the place of fertilization (Behan & Watson, 2006; Alavi *et al.*, 2004; Martínez-López *et al.*, 2009).

In addition, in this work was found a positive correlation between the total antioxidant capacity ($r=0.63$; $p=0.0049$) and the number of cells with less fluidity plasma membrane ($r=0.77$; $p=0.0003$) with fertility *in vivo*, as can be seen in Figure 1A and 1B. These correlations should be associated with a greater mobilization of compounds responsible for the neutralization ROS by cells of higher metabolism (indicated by the greatest mitochondrial functionality) to prevent the establishment of a framework of oxidative stress. In addition, associated with more stable cellular metabolism, represented by cells with lower membrane fluidity. These cells possibly were able to undergo cellular changes

synchronized manner, i.e., greater fluidity obtained only in dealing with female and not early, making them suitable for fertilization. Until now, any work showed this relationship between fertility in swine and those characteristics. This becomes interesting, regarding the use of these laboratory tests to predict fertility.

In this way, the spermatozoa swine have morphophysiological differences related to its fertilising power *in vivo*. Evaluations before recommended, as sperm motility, for differentiation of proven fertility animal are no longer enough. Possibly animals high fertility have greater cellular metabolism due to higher mitochondrial functionality, being able to balance the excessive production of reactive oxygen species due to increased antioxidant capacity. In addition, these cells probably also have a cell metabolism stable and compatible with reproductive events, as indicated by the lower fluidity of the plasma membrane.

This work is the first to relate variables such as greater functionality mitochondrial, less fluidity of membrane and greater total antioxidant capacity on swine spermatozoa of high fertility. These analyzes can be used as biochemical markers to predict fertility in the swine.

DECLARATION OF INTEREST

This work has no conflict of interest.

FINANCING

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial or nonprofit sector.

REFERENCES

- Agarwal A, Durairajanayagam D, Halabi J, Peng J, Vazquez-Levin MH** 2014 Proteomics, oxidative stress and male infertility. *Reproductive BioMedicine Online*. In Press, Accepted Manuscript
- Akpa GN, Suleiman I, Alphonsus C, Adu O** 2012 The variation of age, hair type and body condition score with sperm morphology and cation concentration in yankasa ram. *Elixir International Journal Biology* **47** 8629-8632
- Alavi SMH, Cosson J, Karami M, Amiri BM, Akhoundzadeh MA** 2004 Spermatozoa motility in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*: effects of pH, dilution rate, ions and osmolality. *Reproduction* **128** 819–828.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P** 2004 *Biologia molecular da célula*. 4^a edição, p. 856 – 864 Porto Alegre: Artmed
- Amado LL, Garcia ML, Ramos PB, Freitas RF, Zafalon B, Ferreira JLR, Yunes JS, Monserrat JM** 2009 A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Science of the Total Environment* **407** 2115 – 2123
- Antunes RC** 2007 Avanço tecnológico e aplicabilidade da técnica de congelamento de sêmen suíno. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* **31** 60-63
- Behan JR, Watson PF** 2006 A field investigation of intra-cervical insemination with reduced sperm numbers in gilts. *Theriogenology* **66** 338-343

Benedetti S, Tagliamonte MC, Catalani S, Primiterra M, Canestrari F, De Stefani S, Palini S, Bulletti C 2012 Differences in blood and semen oxidative status in fertile and infertile men, and their relationship with sperm quality. *Reproductive BioMedicine Online* **25** 300–306

Bianchini A, Wood CM 2003 Mechanism of acute silver toxicity in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22** 1361-1367

Birck A, Christensen P, Labouriau R, Pedersen J, Borchersen S 2010 In vitro induction of the acrosome reaction in bull sperm and the relationship to field fertility using low-dose inseminations *Theriogenology* **73** 1180–1191

CBRA 1998 Colégio Brasileiro de Reprodução Animal Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte

Corcini CD, Stephan MHL, Colares EP, Santos ECS, Varela AS JR, Bongalhardo DC, Lucia T JR 2012 In vitro assays for vesper mice (*Calomys laucha*) sperm using coincubation and oocyte's cryopreservation. *Journal of experimental zoology* **154** 96-102

Correa JR, Pace MM, Zavos PP 1997 Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in artificial insemination program. *Theriogenology* **48** 721-31

Rajender S, Rahul P, Mahdi AA 2010 Mitochondria, spermatogenesis and male infertility. *Mitochondrion* **10** 419–428

De Ambrogi M, Spinaci M, Galeati G, Tamanini C 2006 Viability and DNA fragmentation in differently sorted boar spermatozoa. *Theriogenology* **66** 1994-2000

Domínguez-Rebolledo AE, Martínez-Pastor F, Bisbal AF, Ros- Santaella JL, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, et al 2011 Response of thawed epididymal red deer spermatozoa to increasing concentrations of hydrogen peroxide, and importance of individual male variability. *Reproduction in Domestic Animal* **46** 393–403.

Evenson DP, Thompson L, Jost L 1994 Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology* **41** 637–51.

Fernández-Gago R, Domínguez JC, Martínez-Pastor F 2013 Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: A flow cytometry study *Theriogenology* **80** 400–410

Ferreira ALA, Matsubara LS 1997 Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira* **43** 1-16

Gadella BM, Rathi R, Brouwers JFHM, Stout TA, Colenbrander B 2001 Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science* **68** 249-265

Gillan L, Evans G, Maxwell WMC 2005 Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential *Theriogenology* **63** 445–457

Graham JK 2001 Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science* **68** 239-247

Hu JH, Li QW, Zhang T, Jiang ZL 2009 Effect of Gynostemma Pentaphyllum Polysaccharide on boar spermatozoa quality following freezing–thawing. *Cryobiology* **59** 244–249

Hurtado LA, Martin-Hidalgo D, Rodriguez-Gil JE, Gil MC, Garcia-Marin LJ, Bragado LJ, Julia M 2013 AMP-activated kinase, AMPK, is involved in the maintenance of plasma membrane organization in boar spermatozoa *Biochimica et Biophysica Acta* **1828** 2143–2151

Jimenez T, McDermott JP, Sánchez G, Blanco G 2010 Na,K-ATPase alpha4 isoform is essential for sperm fertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **11** 644-649

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER 1990 Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* **186** 464-478.

Lopes TM, Barcarolli IF, Oliveira CB, Souza MM, Bianchini A 2011a. Effect of copper on ion content in isolated mantle cells of the marine clam *Mesodesma mactroides*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **30** 1582-1585

Lopes TM, Barcarolli IF, Oliveira CB, Souza MM, Bianchini A 2011b Mechanism of copper accumulation in isolated mantle cells of the marine clam *Mesodesma mactroides*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **30** 1586–1592

- Marchetti C, Jouy N, Leroy-Martin B, Defossez A, Formstecher P, Marchetti P** 2004 Comparison of four fluorochromes for the detection of inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. *Human Reproduction* **19** 2267-2276
- Lanzafame FM, Vignera S, Vicari E, Calogero AE** 2009 Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility. *Reproductive BioMedicine Online* **19** 638–659
- Ly JD, Grubb DR and Lawen A** 2003 The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. *Apoptosis* **8** 115–128
- Kroemer G, Zamzami N, Susin SA** 1997 Mitochondrial control of apoptosis. *Immunology Today* **18** 44–51.
- Martínez-López P, Santi SM, Treviño CL, Ocampo-Gutiérrez AY, Acevedo JJ, Alisio A, Salkoff LB, Darszon A** 2009 Mouse sperm K⁺ currents stimulated by pH and cAMP possibly coded by Slo3 channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **381** 204–209
- Melo MIV, Henry M, Beker ARCL** 2005 Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen equino resfriado com diferentes diluidores. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **57** 757-763.
- Ménézo Y, Entezami F, Lichtblau I, Cohen M, Belloc S, Brack M** 2012 Stress oxydant et fertilité: fausses évidences et mauvaises recettes. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* **4** 787–796

Muratori M, Porazzi I, Luconi M, Marchiani S, Forti G, Baldi E 2004 AnnexinV binding and merocyanine staining fail to detect human sperm capacitation. *Journal Andrology* **25** 797–810.

Nagy S, Jansen J, Topper EK, Gadella BM 2003 A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biology Reproduction* **68** 1828-35.

Nordberg J, Arnér ESJ 2001 Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine* **31** 1287-1312

Novak S, Smith TA, Paradis F, Burwash L, Dyck MK, Foxcroft GR, Dixon WT 2010 Biomarkers of in vivo fertility in sperm and seminal plasma of fertile stallions. *Theriogenology* **7** 956–967

Oakes KD, Van Der Kraak GJ 2003 Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology* **63** 447–463

Paganini CL, Bianchini A 2009 copper accumulation and toxicity in isolated cells from gills and hepatopancreas of the blue crab (*Callinectes sapidus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* **28** 1200

Petrunkina AM, Volker G, Brandt H, Topfer-Petersen E, Waberski D 2005 Functional significance of responsiveness to capacitating conditions in boar spermatozoa. *Theriogenology* **64** 1766–1782

Piehler E, Petrunkina AM, Ekhlasi-Hundrieser M, Töpfer-Petersen E 2005 Dynamic quantification of the tyrosine phosphorylation of the sperm surface proteins during capacitation in vitro. *Cytometry* **69** 1062–70.

Pinho GLL, Pedroso MS, Rodrigues SC, Souza SS, Bianchini A 2007 Physiological effects of copper in the euryhaline copepod *Acartia tonsa*: waterborne versus waterborne plus dietborne exposure. *Aquatic Toxicology* **84** 62–70

Pursel VG, Johnson LA 1975 Freezing of boar spermatozoa: Freezing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal Animal Science* **40** 99-102.

Quinn JP, White IG, Wirrick BR 1965 Studies of the distribution of the major cations in semen and male accessory secretions. *Journal of Reproduction and Fertility* **10** 379-388

Rodriguez-Martinez H, Larsson B 1998 Assessment of sperm fertilizing ability in farm animal. *Acta Agriculturae Scandinavia* **29** 12-18 (Suppl.)

Russel LD, Ettlín RA, Sinha-Hikkim AP 1990 Histological and histopathological evaluation of the testis. *Clearwater: Cache River*, p.1-40.

Senger PL 2003 Pathways to pregnancy and parturition. 2. ed. 271p. Pullman (WA): Current Conceptions

Silva PFN, Gadella BM 2006 Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* **65** 958-978

STATISTIX® 9 2008 Analytical Software. User's manual. Tallahassee, Florida, USA.

Valsa J, Skandhan KP, Gusani P, Sahab Khan P, Amith S, Gondalia M 2012 Split ejaculation study: semen parameters and calcium and magnesium in seminal plasma. *Central European Journal of Urology* **65** 216-218

Watson PF 2000 The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* **60/61** 481-492

Xu X, Pommier S, Arbov T, Hutchings B, Sotti W, Foxcroft Gr 1998 In vitro maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. *Journal of Animal Science* **76** 3079- 3089.

LEGENDS OF FIGURES

Figure 1: Graph of normality *in vivo* fertility of Landraces swine.

Figure 2: Graph of correlation with *in vivo* fertility. A) Correlation between fluidity of the plasma membrane. B) Correlation between total antioxidant capacity.

FIGURES

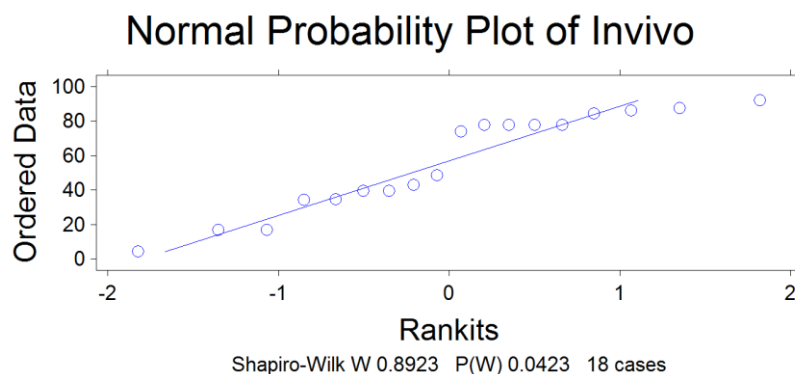
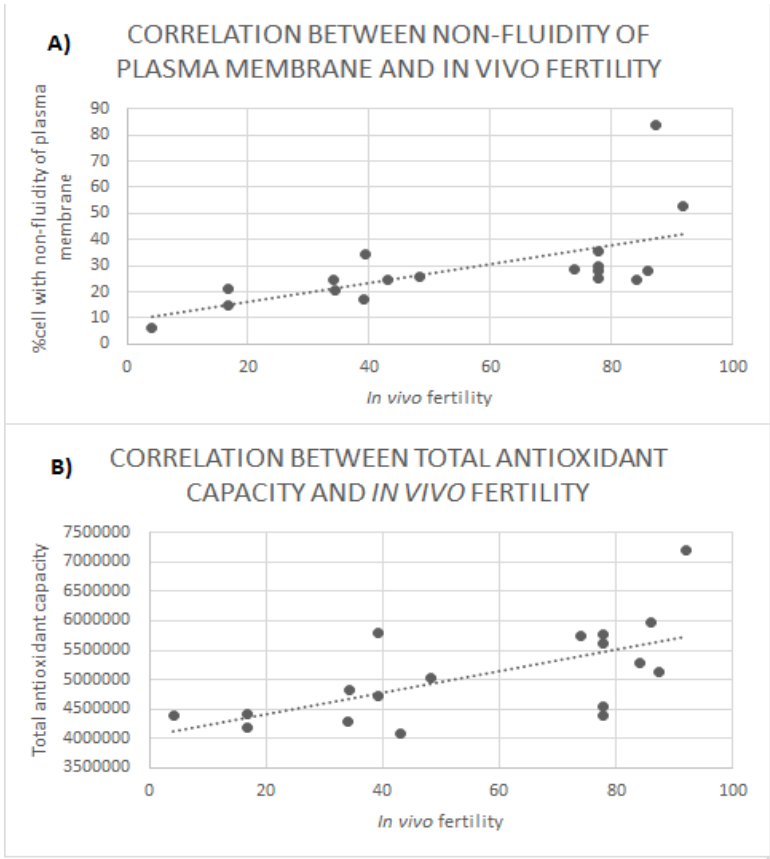


Figure 1



Figure

2

VI. CONCLUSÃO GERAL

Os espermatozoides, embora possuam a mesma finalidade - de levar o material genético do progenitor masculino e fecundar o oócito, possibilitando o desenvolvimento de um novo indivíduo, podem divergir quanto às suas características funcionais e estruturais entre as espécies. A compreensão dessas diferenças é fundamental para proporcionar noções acerca da fisiologia básica do gameta e dos mecanismos celulares que possibilitam que um espermatozoide fecunde o gameta feminino.

Os resultados do presente estudo mostraram que espermatozoides suínos de alta fertilidade, divergem daqueles de animais de baixa fertilidade por apresentarem uma menor fluidez de membrana plasmática, maior atividade mitocondrial e maior atividade antioxidante total.

Esses resultados sugerem que a célula espermática de maior potencial de fertilização possui um metabolismo celular acelerado, devido à maior funcionalidade da mitocôndria, acompanhado de uma maior habilidade de controle dos radicais livres produzidos por essas, devido a uma maior capacidade antioxidante total. Ainda, essas células demonstraram a necessidade de passar por modificações pós-maturação de forma sincronizada com os eventos reprodutivos, não sofrendo processos de capacitação precoce, representado pela fluidez de membrana antes do ingresso no trato reprodutivo feminino.

Este estudo é o primeiro a relacionar essas avaliações com o poder fertilizante *in vivo* de suínos. A compreensão da fisiologia da célula espermática suína, bem como o conhecimento das estruturas que de fato estão interferindo nos eventos reprodutivos é essencial para agregar conhecimento da fisiologia basal desta celular, além de direcionar estudos e otimizar métodos capazes de permitir num futuro próximo a ampliação do uso da espécie suína como modelo biomédico. Ainda, pesquisas desse tipo trazem a possibilidade de determinar os marcadores bioquímicos para a fertilidade, estimando de forma rápida a fertilidade animal. Além de auxiliar no direcionamento de estudos e métodos para melhorar a reprodução desses animais, permitindo assim, seu uso como modelo animal e a preservação de seu germoplasma.

VII. REFERÊNCIAS GERAIS

AITKEN, R. J.; GORDON, E.; HARKISS, D.; TWIGG, J. P.; MILNE, P.; JENNINGS, Z.; IRVINE, D. S. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1037-1046, 1998.

AITKEN, R.J., PATERSON, M., FISHER, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. **Biology of Reproduction**, v.41, p.183–197. 1989.

ALBERTS, B. Fundamentos da Biologia Celular: uma introdução à biologia molecular da célula. 3 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1294p. 1999.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L.(Ed). Equine Reproduction. Philadelphia: Lea & Febiger, p.715-745. 1992.

AREEKIJSEREE, M.; VEERAPRADITSIN, T. Characterization of porcine oviductal epithelial cells, cumulus cells and granulosa cells-conditioned media and their ability to induce acrosome reaction on frozen-thawed bovine spermatozoa. **Micron**, v. 39, p. 160-167, 2007.

BANKS, W. J. Histologia Veterinária Aplicada, 2ª ed. São Paulo: Editora Manole, 629p. 1992.

BARTH A.D; Oko R.J. Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. Ames: Iowa State. University Press, 1989

BREIBART, H.; COHEN, G.; RUBINSTEIN, S. Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. **Reproduction**, v. 129, p. 263-268, 2005.

BRINSKO, S.P. Fisiologia reprodutiva do macho. In: CUNNINGHAM, J.G. (Ed). Tratado de Fisiologia Veterinária. 2.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p.399-405. 1999.

BUFFONE, M. G.; CALAMERA, J. C.; VERSTRAETEN, S. V.; DONCEL, G. F. Capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation and membrane fluidity changes are impaired in the spermatozoa of asthenozoospermic patients. *Reproduction Research*, v. 129, p. 697-705, 2005.

CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; SURAI, P.; NOBLE, R. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. ***Animal Reproduction Science***, v.58, p.99–111. 2000.

CHRISTOVAN, Y.; JAMES, P.; MACKIE, A.; COOPER, T.G.; JONES, R. Molecular diffusion in sperm plasma membranes during epididymal maturation. ***Molecular and Cellular Endocrinology***, v.216, p.41-46, p.3-24. 2004.

CIERESZKO, A., GLOGOWSKI, J., DABROWSKI, K. Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. In: *Cryopreservation in Aquatic Species*. Tiersch, T.R. and Mazik, P.M., Editors. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. p 20-48, 2000.

CONNELL, M. O.; McCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. ***Human Reproduction*** v. 17, p. 704-709, 2002.

COOPER, G. M. *The cell: a molecular approach*. Washington: **ASM Press**, 673p. 1996.

CORCINI, C.D.; VARELA, A.S.; PIGOZZO, R.; RAMBO, G.; GOULARTE, K.L.; CALDERAM, K ; LEON, P.M.M.; BONGALHARDO, D.C.; LUCIA, 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 (Print)***, v. 145, p. 28-33, 2012.

de LAMIRANDE, E.; GAGNON, C.A. Positive role of the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v.16, p.21–25. 1993.

DE ROBERTIS, E.M.F.; HIB, J. As mitocôndrias. In: Bases da biologia Celular e Molecular. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 3.ed., p.155-175, 2001.

FIRMO, J.O.A; UCHÔA, E.; LIMA-COSTA, M.F. Projeto Bambuí: fatores associados ao conhecimento da condição de hipertenso entre idosos. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 20 n. 2, p. 512-521. 2004.

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

FORD, W.C. Regulation of sperm functions by reactive oxygen species. **Human Reproduction Update**, v.10, p.387–399. 2004.

GADELLA, B. M.; RATHI, R.; BROUWERS, J. F.; STOUT, T. A.; COLENBRANDER, B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 249-265, 2001.

GIOJALAS, L.C.; ROVASIO, R.A. Mouse spermatozoa modify their motility parameters and chemotactic response to factors from the oocyte microenvironment. **International Journal of Andrology**, v.21, p. 201–6. 1998.

GRAHAM, J. K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.239-247, 2001.

GROENEN, M.A.M.; ARCHIBALD, A.L.; UENISHI, U.; et al. Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. **Nature**. V. 491, p. 393–398. 2012

GUTHRIE, H.D., WELCH, G.R. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. **Journal Animal Science**, v. 84, p.2089–2100. 2006.

HEIDEMANN, S.R. A base molecular e celular da regulação fisiológica In: CUNNINGHAM, J.G. (Ed). Tratado de Fisiologia Veterinária. 2.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1999.

HU, J.H.; LI, Q.W.; ZHANG, T.; JIANG, Z.L. Effect of Gynostemma Pentaphyllum Polysaccharide on boar spermatozoa quality following freezing–thawing. **Cryobiology**, v.59, p. 244–249, 2009.

JOHNSON, LA.; WEITZE, KF.; FISER, P.; MAXWELL, WMC. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.143-172, 2000.

JONES, R. Spermiogenesis and sperm maturation to development of fertilizing capacity. In: LAURIA, A. GANDOLFI, F.; ENNE, G.; GIANAROLI, L. **Gametes, development and function**. Roma: Serono Symposia, p.205-218. 1998.

KARADAS, F.; SURAI, P.F. Interações entre selênio e vitamina E: será que 1+1 é igual a mais de 2? Re-imaginando a indústria de alimentação animal. In: Simpósio Brasileiro Alltech, 2004, Curitiba, Anais... Curitiba: Alltech Biotechnology, p.56-73. 2004.

KIRICHOK, Y.; NAVARRO, B.; CLAPHAM, D.E. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel. **Nature**, v. 439, p737–40. 2006

KIRK ALLAN D. Crossing the bridge: large animal models in translational transplantation research. **Immunological Reviews**. V.96, p.176-196. 2003.

KNOLBIL AND NEILL. Physiology of Reproduction. Academic Press, edição 3. 2005.

LENZI, A.; PICARDO, M.; GANDINI, L. et al. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Human Reproduction Update**, v.2, p.246-256, 1996.

LOPES, S.; JURISICOVA, A.; SUN, J.G.; CASPER, R.F. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. **Human Reproduction**, n.13, p.896–900. 1998.

MAŇÁSKOVÁ. P., JONÁKOVÁ, V. Localization of porcine seminal plasma (PSP) proteins in the boar reproductive tract and spermatozoa. **Journal of Reproductive**, V. 78, p :40-8. 2007.

MARCHETTI, C.; JOUY, N.; LEROY-MARTIN, B.; et al. Comparison of four fluorochromes for the detection of inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. **Human Reproduction**, v. 19, p. 2267-2276, 2004.

MARTÍNEZ-LÓPEZ P.; SANTI CM.; TREVIÑO CL.; GUTIÉRREZ AY, ACEVEDO JJ, ALISIO A. SALKOFF LB.; DARSZON A. Mouse sperm K+ currents stimulated by pH and cAMP possibly coded by Slo3 channels. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. V. 381, p. 204–209. 2009

MEN, N.T.; KIKUCHI, K.; NAKAIA, M.; FUKUDAB, K.; TANIHARAA, F.; NOGUCHIA, J.; KANEKOA, J.; LINHF NV.; NGUYENF, BX.; NAGAIE T.; TAJIMAC, T. Effect of trehalose on DNA integrity of freeze-dried boar sperm, fertilization, and embryo development after intracytoplasmic sperm injection. **Theriogenology** V. 80, p. 1033–1044. 2013

MIES FILHO, A. Fisiologia do aparelho genital masculino. In: (Ed). *Reprodução dos Animais*. V.1, 6.ed. Porto Alegre: Editora Salina, p.98-132. 1987.

NISHIMUNE, Y.; OKABE, M. Mammalian male gametogenesis, growth, differentiation and maturation of germ cells. **Development and Growth Differentiation**, v.34, p.479-486, 1993.

NOVAK, S.; SMITH, T.A.; PARADIS, F.; BURWASH, L.; DYCK, M.K.; FOXCROFT, G.R.; DIXON W.T. Biomarkers of in vivo fertility in sperm and seminal plasma of fertile stallions. **Theriogenology** v.74, p. 956–967. 2010

ONG, C. N.; SHAN, A. M.; CHIA, S. E. Biomarkers for male reproductive health hazards: Are they available? **Toxicology Letters**, v. 134, p. 17-30, 2002.

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

PAULENZ, H.; TAUGBOL, O.; Kommisrud, E.; GREVLE I. S.; Effect of dietary supplementation with cod liver oil on cold shock and freezability of boar semen. **Reproduction Domestic Animals**, v. 34, p. 431-435, 1999.

PONS-REJRAJI, H.; BAILEY, J. L.; LECLERC, P. Modulation of bovine sperm signaling pathways: correlation between intracellular parameters and sperm capacitation and acrosome exocytosis. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, p. 511-524, 2009.

QI, H.; MORAN, M.M.; NAVARRO, B.; et al. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**; v.104, p. 1219–23. 2007

RIBEIRO, S.M.R.; QUEIROZ, J.H.; PÉLÚCIO, M.C.G.; COSTA, N.M.B.; MATTA, S.L.P.; QUEIROZ, M.E.L.R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Journal of Biosciences**. Brasil, v.2, p, 133-149. 2005.

RUSSEL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHA-HIKKIM, A.P. Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater: Cache River, p.1-40. 1990

SEKI, N., TOYAMA, Y., NAGANO, T Changes in the distribution of filipinsterol complexes in the boar sperm head plasma membrane during epididymal maturation and in the uterus. **The Anatomical Record**, v.232, p.221-30, 1992.

SENGER, P. L. Pathways to pregnancy and parturition. 2. ed. Pullman (WA): Current Conceptions, 271p. 2003.

SHAMI, N.J.I.; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**. Campinas. v. 17, n. 2, p. 227-236, abr/jun., 2004.

SILVA, A. E. D. F. Reação acrossômica induzida: método indicador de fertilidade de touros. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia,. 38p. 1998

SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v.65, p.958-978, 2006

SINGER, S. J., NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v.175, p.720-31, 1972.

STEINBRECHER, U.P.; ZHANG, H.F.; LONGHEED, M. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 9, n. 2, p. 155-168, 1990.

STRYER, L. Estrutura e dinâmica de membranas. In: _____. (Ed). Bioquímica. 4.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1996a. p.245-271.

SULEIMAN, S. A.; ELAMIN ALI, M.; ZAKI, Z. M. S.; EL-MALIK, A. M. A.; NASR, M. A. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. **Journal of Andrology**, v. 17, n. 5, p. 530-537, 1996.

THOMAS, A. D.; MEYERS, S. A.; BALL, B. A. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. **Theriogenology**, v. 65, p. 1531-1550, 2006.

TOMÁS, C.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J.; GÓMEZ-IZQUIERDO G.; DE MERCADO E. Effect of the holding time at 15 °C prior to cryopreservation, the thawing rate and the post-thaw incubation temperature on the boar sperm quality after cryopreservation. **Animal Reproduction Science** V. 144, p.115-121. 2014

TRAVIS, A. J.; KOPF, G. S. The of cholesterol efflux in regulation the fertilization potencial of mammalian spermatozoa. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 110, p. 731-736, 2002.

TRZCINSKA, M.; BRYLA, M.; SMORAG, Z. Apoptotic-like changes in the spermatozoa of fresh and stored boar semen and the quality of embryos produced in vivo. **Animal Reproduction Science**. V.124, p.90–97. 2011

WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm cell membranes In: MORRIS, E. J.; CLARK, A. (Eds). The effects of low temperatures on biological membranes. **London: Academic Press**, p.189-218. 1981

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: Knobil, E.; Neill, J.D. The Physiology of Reproduction. **Raven Press**, New York, p. 189-317, 1994.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**. v. 74, n. 1, jan. p. 139–162, 1994.

ZENG, X.H.; YANG, C.; KIM, S.T.; LINGLE, C.J.; XIA, X.M. Deletion of the Slo3 gene abolishes alkalization -activated K⁺ current in mouse spermatozoa. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, p. 5879–84. 2011