

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTEc  
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Utilização de Extrato de Própolis no Congelamento de Sêmen Suíno

**Tainã Figueiredo Cardoso**

Pelotas, 2013

**Tainã Figueiredo Cardoso**

## Utilização de Extrato de Própolis no Congelamento de Sêmen Suíno

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador do Estágio: Prof. Dr<sup>a</sup> Carine Dahl Corcini  
Orientador Acadêmico: Prof. PhD. Fábio Pereira Leivas Leite

Pelotas, 2013

Dados de catalogação na fonte:  
Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB 10/1032  
Biblioteca de Ciência & Tecnologia – UFPel

**C268u      Cardoso, Tainã Figueiredo**

**Utilização de extrato de própolis no congelamento de sêmen suíno / Tainã Figueiredo Cardoso. – 64f. – Monografia (Conclusão de curso) Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico, 2013. – Orientador Fábio Pereira leivas Leite; co-orientador Carine Dahl Corcini.**

## **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Ph.D. Fábio Pereira Leivas Leite, Universidade Federal de Pelotas.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Diaz de Oliveira, Universidade Federal de Pelotas.

Msc. Jorgea Pradieé, Universidade Federal de Pelotas.

Msc. Elisa Caroline da Silva Santos, Universidade Federal de Pelotas.

*“Seja a mudança que você quer ver no mundo.”*

Dalai Lama

## **Agradecimentos**

Ao meu avô, Manuel, pelo apoio e companherismo no começo de minha vida escolar, talvez sem seu apoio este momento não estivesse sendo realizado.

Aos meus pais, Jorge e Denize, pelo amor incondicional, por apoiarem e confiarem nas minhas decisões. A minha irmã Thaís pelo companherismo. E aos meus demais familiares. Pois sem vocês eu não seria nada!

Ao meu namorado Juliano, pelo amor, pelos conselhos e por entender minhas ausências.

Ao meu orientador Prof<sup>o</sup> Fábio Leivas, por ter aceito o convite de orientação e por sua dedicação.

Aos meus orientadores, Carine Corcini e Antônio Sérgio, pela confiança depositada em mim e pela amizade construída nesses anos.

A Estela Fernandes e S. – minha quase irmã - pelo companherismo e amizade, principalmente durante o desenvolvimento deste trabalho.

A Janaina, Jeorgea e Vitória, pelo auxílio e por não enlouquecerem com a gente.

Aos demais estagiários e professores do Laboratório de Reprodução Animal (ReproPel) e do Laboratório de Reprodução Animal – EMBRAPA, em especial a Dr<sup>a</sup> Lígia, Gustavo Gastal, Jorgea Predieé, Elisa Santos, Alexander Gonçalves, os quais tive a oportunidade de acompanhar de forma mais próxima seus trabalhos - pela paciência, confiança e amizade.

A cooperativa Languiru, pelas doses utilizadas neste trabalho.

E por fim, a todos que de forma direta e indiretamente contribuíram com a realização deste sonho.

**MUITO OBRIGADA!!!!**

## Resumo

CARDOSO, Tainã F. **Utilização de Extrato de Própolis no Congelamento de Sêmen Suíno**. 2012. 63f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O congelamento de sêmen suíno ainda não é uma realidade em nível comercial, devido principalmente, as características intrínsecas da célula espermática, propensa ao ataque de radicais livres. Desta forma, uma alternativa seria a incorporação de antioxidantes ao diluente de congelamento. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antioxidante de extrato de própolis no congelamento de sêmen suíno, sobre qualidades celulares *in vitro*. Para isso, foram utilizados 20 ejaculados, coletados através da técnica de mão enluvada. Posteriormente, junto ao diluente de refrigeração, a base de gema de ovo e lactose 11%, foi adicionado o extrato de própolis (20 mg/mL) para concentrações finais de 0,05; 0,1; 0,15 e 0,2% (v/v). Tanto no sêmen fresco, quanto no pós-descongelamento foram realizadas as análises de motilidade, integridade de membrana e acrossoma, e funcionalidade mitocondrial. No sêmen descongelado foram realizadas ainda as análises de integridade de DNA, teste de penetração *in vitro*, número de espermatozoides por oócitos, quantificação de espécies reativas de oxigênio e capacidade antioxidante total. Todas as variáveis foram analisadas pelo teste Kruskal-Wallis no programa Statistica 9.0. Não houve diferença estatística entre os tratamentos contendo diferentes concentrações de extrato de própolis e o controle para todas as variáveis analisadas. Portanto não foi encontrada ação antioxidante do extrato de própolis pós-descongelamento de sêmen suíno, bem como não houve incremento nos parâmetros de qualidade seminal analisados.

Palavras-Chave: Adjuvante. Antioxidante. Criopreservação.

## **Abstract**

CARDOSO, Tainã F. **Utilização de Extrato de Própolis no Congelamento de Sêmen Suíno**. 2012. 63f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Freezing of boar semen is not yet a reality in commercial level, due mainly to the intrinsic characteristics of the sperm cell, prone to attack by free radicals. Thus, an alternative would be the incorporation of antioxidants to the diluent freezing. The aim of this study was to evaluate the antioxidant activity of propolis in freezing boar semen on in vitro cell qualities. For this, we used 20 ejaculates collected via the gloved hand technique. Subsequently, with the thinner cooling, the base of egg yolk and 11% lactose was added propolis extract (20 mg / mL) to final concentrations of 0.05, 0.1, 0.15 and 0.2 % (v / v). Both in fresh semen, as in post-thaw were conducted analyzes of motility, and acrosome membrane integrity and mitochondrial function. In thawed semen were also performed analyzes of DNA integrity, in vitro penetration test, number of spermatozoa per oocyte, quantification of reactive oxygen species and total antioxidant capacity. All variables were analyzed using the Kruskal-Wallis test in Statistica 9.0. There was no statistical difference between treatments containing different concentrations of propolis extract and control for all variables. So there was no antioxidant activity of propolis extract after thawing of boar semen, and there was no increase in semen quality parameters analyzed.

Key Words: Adjuvant. Antioxidant. Cryopreservation.



## Lista de Tabelas

Tabela 1: Concentração de compostos fenólicos presentes na amostra de própolis utilizada.

..... 50

Tabela 2: Motilidade espermática (MOT), integridade da membrana (MEM) e do acrossoma (ACRO) e funcionalidade mitocondrial (MIT), à fresco e após o descongelamento de sêmen suíno com diluente incluindo diferentes concentrações de própolis (médias  $\pm$  EPM)\* – expresso em porcentagem.....51

Tabela 3: Integridade de DNA, taxa de penetração espermática (TP) e número de espermatozoide por oócito (ESP), em porcentagem, após o descongelamento de sêmen suíno com diluente incluindo diferentes concentrações de própolis (médias  $\pm$  EPM).....51

Tabela 4: Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e capacidade antioxidante total (TOSC) expressa pela área por unidade de fluorescência, após o descongelamento de sêmen suíno com diluente incluindo diferentes concentrações de própolis (médias  $\pm$  EPM).....52

## **Lista de Abreviaturas e Siglas**

ABAP - 2,2' –azobis (2-metilpropionamidina) dihidroclorato

BTS - Solução de descongelamento *BTS*®

cm – Centímetros

DC - Diluente de Congelamento

DI- Doses Inseminantes

DMA - N,N Dimetilacetamida

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DR - Diluente em Resfriamento

EROs - Espécies Reativas De Oxigênio

g – Gramas

h – Horas

H2DCF-DA - 2'7'Diacetato de Diclorofluoresceína

IA - Inseminações Artificiais

IP – Iodeto de Propídio

m – Metros

min – Minuto

mL – Mililitro

nm – Nanômetro

PBS – Solução salina tamponada

Rh123 – Rhodamina 123

s – Segundos

v – Volume

$\mu$ L – Microlitros

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	14
<b>2. ARTIGO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
RESUMO .....	18
ABSTRACT .....	19
INTRODUÇÃO .....	19
CARACTERÍSTICAS DA CÉLULA ESPERMÁTICA SUÍNA .....	21
MANIPULAÇÕES NO SÊMEN PARA CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO .....	23
DILUENTES PARA RESFRIAMENTO E CONGELAMENTO .....	25
ANTIOXIDANTES .....	28
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	29
REFERÊNCIAS .....	30
<b>3. OBJETIVO GERAL</b> .....	39
<b>4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	39
<b>5. MATERIAIS E METODOS</b> .....	39
5.1 Preparo do extrato de própolis verde .....	39
5.2 Coleta de sêmen .....	40

5.3	Processamento do ejaculado e criopreservação.....	41
5.4	Avaliações <i>in vitro</i> de qualidade espermática .....	43
5.4.1	Motilidade espermática: .....	43
5.4.2	Integridade de membrana plasmática.....	44
5.4.3	Integridade de acrossoma: .....	44
5.4.4	Integridade de DNA: .....	45
5.4.5	Funcionalidade mitocondrial: .....	46
5.4.6	Teste de penetração oocitária: .....	46
5.5	Avaliações bioquímicas.....	48
5.5.1	Teste de cinética ERO:.....	48
5.5.2	Capacidade antioxidante total (TOSC): .....	48
5.6	Análise estatística .....	49
6.	RESULTADOS .....	50
7.	DISCUSSÃO.....	52
8.	CONCLUSÃO.....	56
9.	REFERÊNCIAS .....	56

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O uso de inseminações artificiais (IAs) são predominante em matrizes do plantel tecnificado em granjas de produção de suínos (BORTOLOZZO et al., 2005). Atualmente a técnica é conduzida principalmente através da utilização de doses inseminantes (DI) resfriadas, à temperatura de 15-18 °C, acondicionadas em diluente padrão (solução de descongelamento *BTS*®) por, no máximo, cinco dias (JOHNSON et al., 2000).

O uso de doses congeladas é altamente desejável para a suinocultura, sobretudo para a internacionalização de mercados da espécie, por contribuir para a manutenção de germoplasma, preservação e dispersão da diversidade genética e controle da transmissão de patógenos (BAILEY et al., 2008).

Atualmente a utilização de sêmen congelado é restrita a programas de melhoramento, formação de bancos genéticos e pesquisas científicas (HOFMO & GRELVE, 2000). Pois para uma IA utilizando sêmen congelado se faz necessário uma DI com número de espermatozoides de duas a três vezes maiores do que com

as doses tradicionais (JOHNSON et al., 2000). Além de apresentar índices reprodutivos insatisfatórios e inconsistentes, reduzindo a taxa de parição e tamanho da leitegada por parto (HOFMO & GRELVE, 2000; JOHNSON et al., 2000), o que inviabiliza economicamente sua utilização em larga escala.

A técnica de criopreservação de sêmen suíno ainda não atingiu uma padronização, como ocorre na espécie bovina (WATSON, 2000), principalmente devido às características intrínsecas da célula espermática suína quando comparada a de outros mamíferos, uma vez que estas são mais suscetíveis a alterações estruturais e funcionais – fato que diminui sua capacidade fertilizante (BUHR et al., 1994; WATSON, 2000).

A grande concentração de ácidos graxos insaturados nos fosfolipídios presentes na membrana plasmática do espermatozoide suíno, com poucas ligações duplas do tipo *cis* (CEROLINI et al., 2000), faz com que durante o processo de criopreservação aumente significativamente a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) não contrabalanceada em nível celular dada à baixa concentração de antioxidantes presentes no plasma seminal suíno (BREZEZINSKA-SLEVBODZINSKA et al., 1995).

EROs têm efeito duplo sobre a função do espermatozoide, em concentrações baixas, induz a capacitação espermática (FORD, 2004), a hiperativação (DE

LAMIRANDE & GAGNON, 1993), inibe a reação acrossomal prematura (AITKEN et al., 1995), e auxilia na fusão do espermatozoide-oócito (AITKEN et al., 1989). Contudo em quantidades excessivas, diminui a motilidade dos espermatozoides (GUTHRIE & WELCH, 2006), inibi da fusão espermatozóide-oócito (AITKEN et al., 1989) e promove danos ao DNA (LOPES et al., 1998),

Uma maneira para transpor esse problema poderia ser a incorporação de antioxidantes no diluente de congelamento, visando um balanço entre a produção de EROs e a quantidade de antioxidantes.

Como alternativa antioxidante pode utilizar-se da própolis verde - substância resinosa de composição complexa, coletada principalmente a partir da espécie vegetal *Baccharis dracunculifolia* (BÚFALO et al., 2010) por abelhas. O uso do própolis já foi relatado para um amplo espectro de atividades biológicas, tais como antibiótica, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, antitumoral e antioxidante (KIMOTO et al., 1995; PARK et al., 1998; KUJUMGIEV et al., 2005; CASTILHO, 2009).

Resultados demonstraram seu efeito protetor aos espermatozoides humanos *in vivo*. Estes podem estar relacionados, pelo menos em parte, pela capacidade antioxidante de seus componentes ativos, evidenciando sua capacidade de proteger



a membrana espermática, reduzindo o ataque oxidativo e peroxidação lipídica (RUSSO, 2006).

Os extratos etanoicos presentes na própolis possuem um alto conteúdo de flavonóides (MORENO et al., 2000; NAGAI et al., 2003) - associados com a atividade antioxidante através da inibição da atividade de enzimas envolvidas na conversão de ácidos graxos poliinsaturados de membrana em mediadores celulares como fosfolipase A2, ciclooxigenase e lipooxigenase, além de uma potente atividade de combate aos radicais livres (NAGAI et al., 2003).

Assim, este trabalho objetivou avaliar a utilização do extrato de própolis, em diferentes concentrações, no congelamento de sêmen visando incrementar a qualidade do sêmen suíno pós-descongelamento.

## **2. ARTIGO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Criopreservação de sêmen suíno: avanços tecnológicos e perspectivas.

Artigo de revisão formatado de acordo com as normas da Revista Ciência  
Animal.

Criopreservação de sêmen suíno: avanços tecnológicos e perspectivas.

(Cryopreservation of boar semen: technological advances and perspectives)

Tainã Figueiredo Cardoso<sup>1,2</sup>; Estela Fernandes e Silva<sup>1,2</sup>; Carine Dalh Corcini<sup>1\*</sup>

<sup>(1)</sup> ReproPel, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Capão do Leão, s/nº. Caixa Postal 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS.

<sup>(2)</sup> Graduação em Biotecnologia – Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Campus Capão do Leão, s/nº. Caixa Postal 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS.

## RESUMO

A criopreservação de sêmen suíno é uma biotécnica ainda não consolidada devido à alta sensibilidade do espermatozoide da espécie ao processo de congelamento/descongelamento. Contudo sua utilização é altamente desejável para o intercâmbio genético e manutenção da biossegurança. Esta revisão tem como objetivo apontar os consideráveis avanços que têm sido desenvolvidos nos últimos anos, dado ao aperfeiçoamento das técnicas já existentes, como caracterização do ejaculado, ajustes na remoção do plasma seminal e uso de adjuvantes na confecção dos diluentes. Tornando sua aplicabilidade comercial possível nos próximos anos.

Palavras-chave: espermatozoide, antioxidantes, diluentes, congelamento.

## **ABSTRACT**

Cryopreservation of boar semen is a biotechnique still unconsolidated due to high sensitivity of the sperm of the species to freezing / thawing process. However its use is highly desirable to genetic exchange and maintenance of biosafety. This review aims to point out the considerable advances that have been developed and improvement of existing techniques, such as characterization of the ejaculate, adjustments in the removal of seminal plasma and adjuvants for making diluents. Making its commercial applicability possible in the coming years.

Keywords: sperm, antioxidants, diluents, freezing.

## **INTRODUÇÃO**

A criopreservação de sêmen é uma biotécnica reprodutiva consolidada e difundida desde 1975 (Grossfeld et al., 2008). Contudo, com relação à espécie suína, ainda existem muitas dificuldades no processo de criopreservação do sêmen, devido à notória sensibilidade dos espermatozoides ao processo de congelamento/descongelamento.

Melhorar a fertilidade do sêmen congelado/descongelado tem sido um dos objetivos da comunidade científica e da indústria suína, pois a utilização do sêmen suíno criopreservado é altamente desejável, principalmente para a internacionalização de mercados da espécie, para a manutenção de germoplasma, preservação e dispersão da diversidade genética, e o controle da transmissão de patógenos, impedindo a disseminação de patologias, como a Síndrome Multissistêmica Pós-Desmame e a Síndrome Respiratória (Bailey et al., 2008).

Contudo, esta tecnologia ainda não é suficiente para reproduzir índices de fertilidade satisfatórios após a inseminação artificial (IA) quando comparada ao sêmen resfriado (Johnson et al., 2000; Roca et al., 2003), devido à perda da capacidade fertilizante e da não sobrevivência de 40-50% dos espermatozoides durante o processo de criopreservação (Watson et al., 2000). Fato que resulta em uma diminuição das taxas de parição, em cerca de 20 - 30% e do tamanho da leitegada de 2 - 3 leitões (Romero et al., 2004).

A biotécnica de criopreservação compreende todo o processo de manipulação do ejaculado, correspondendo à diluição, resfriamento, crioproteção, congelamento, armazenamento a - 196 °C e descongelamento (Hammerstedt et al., 1990). Sendo dependente das interações de fatores internos (características inerentes dos espermatozoides e das diferenças entre machos e ejaculados) e fatores externos (composição de diluentes, tipo e concentração de agentes crioprotetores, taxas de diluição e de refrigeração, do congelamento e do descongelamento). A relação destes fatores é capaz de influenciar a capacidade do espermatozoide em sobreviver e manter suas qualidades fertilizantes ao final do processo e, portanto, determinante para o sucesso da técnica (Kamaruddin et al., 2004).

Desta forma, a presente revisão, tem como objetivo ressaltar alguns fatores limitantes do processo de criopreservação de sêmen suíno, apontando as adaptações realizadas até o presente momento nas distintas etapas do processo e suas perspectivas.

## **CARACTERÍSTICAS DA CÉLULA ESPERMÁTICA SUÍNA**

De modo geral, o processo de criopreservação causa inúmeros danos à célula espermática, reduzindo a proporção de espermatozoides viáveis, bem como sua capacidade funcional (Watson, 2000; Medeiros, 2002). As lesões ocasionadas têm sido atribuídas à mudança de temperatura - resultando na formação de cristais de gelo intracelulares e extracelulares, danos oxidativos, alterações de membrana e DNA - além da toxicidade de crioprotetores e estresse osmótico (Watson, 2000).

Em nível celular, os danos ocasionados levam ao aumento da permeabilidade da membrana plasmática, inibição da atividade enzimática e alteração do balanço bioenergético celular (Hammerstedt & Graham, 1992; Fahy, 1996), contudo cada espécie possui um potencial de crioproteção distinto, devido a características intrínsecas de suas células (Ladha, 1998; Watson, 2000; Purdy, 2006).

Um dos grandes desafios para a criopreservação de sêmen suíno são as particularidades de sua célula espermática quando comparada com a de outras espécies. O espermatozoide suíno possui uma menor porcentagem de moléculas de colesterol em sua membrana plasmática, distribuídas de forma assimétrica, com maior disposição na monocamada interna (Paulenz et al., 1999; Johnson et al., 2000). Essas diferenças estruturais contribuem para a grande sensibilidade ao choque térmico, caracterizado por uma redução da motilidade e danos funcionais de membrana e acrossoma (Holt, 2000; Saravia et al, 2005).

Outra peculiaridade é a grande concentração de ácidos graxos insaturados nos fosfolípidos presentes na membrana plasmática, com poucas ligações duplas do tipo *cis* (Cerolini et al., 2000), tornando esta célula suscetível à peroxidação lipídica, devido ao estresse oxidativo produzido pelas espécies reativas de oxigênio (EROs). A produção excessiva e desequilibrada EROs resulta em numerosos resultados indesejáveis como danos da membrana, inibição da respiração e vazamento de enzimas intracelulares (Tavilani et al., 2008). Este fato ainda é agravado pela baixa capacidade antioxidante do plasma seminal suíno (Brezezinska-Slebodzinska et al., 1995).

Além disso, existe uma grande variação entre raças e, inclusive, entre ejaculados de um mesmo indivíduo (Macedo et al., 2006; Corcini et al., 2012). Isto demonstra uma possível relação genética no processo de criopreservação, capaz de influenciar em uma expressão proteica ou de lipídeos da composição da membrana diferentes, ou ainda em alterações na composição do plasma seminal ou funcionalidade das glândulas acessórias (Holt et al. 2005). Contudo essas variabilidades são determinadas por vários fatores, alguns desconhecidos, e outros ainda pouco estudados.

## MANIPULAÇÕES NO SÊMEN PARA CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO

Como citado anteriormente, a tolerância ao congelamento é influenciado por características individuais do macho e ejaculado, ou até mesmo entre as porções coletadas de um mesmo ejaculado (Rodríguez- Martínez et al, 2008; Saravia et al, 2009).

Os primeiros 10mL do ejaculado são considerados como “esperma rico”, apresentando uma maior tolerância à criopreservação, pois se acredita que esta porção possui uma quantidade substancial de fluido da cauda do epidídimo, incluindo proteínas relevantes como a prostaglandina sintase com peso molecular de 10,56 kDa (Siqueira et al.,2011 ) e outras com 18, 19, 44, 65, 80 e 100 kDa (Corcini et al., 2012), relacionadas com melhores resultados na criopreservação, devendo-se priorizar esta porção para o processo.

Após a coleta, uma das etapas primordiais para o congelamento, é a remoção do plasma seminal, geralmente utilizada para melhorar a motilidade do esperma congelado/descongelado e fertilidade *in vitro* (Kawano et al., 2004). Esta etapa é recomendada principalmente para machos considerados maus congeladores (Okazaki et al., 2009). Uma pré-incubação com o plasma seminal ainda é bastante controversa. Alguns autores indicam uma pré-incubação de pelo menos 24h a 15 °C de todo ejaculado, visto que este tempo de estabilização melhora sua congelabilidade (Abeydeera et al., 1998; Grossfeld et al., 2005), enquanto, há relatos de efeito prejudicial do plasma seminal especialmente em



espermatozoides armazenados por pelo menos 6h antes da criopreservação (Moore et al., 2005)

Para a remoção do plasma seminal e concentração dos espermatozoides de modo que eles possam ser rediluídos com extensores de congelamento, é necessário o uso de centrifugações, sendo o tempo de centrifugação considerado mais crítico do que a força G aplicada para a indução de danos espermáticos (Katkow e Mazur, 1998; Rijsselaere et al., 2002). Carvajal et al. (2004) testou diferentes forças e tempo de centrifugação, analisando a recuperação espermática com acrossoma íntegros e sobrevida celular, indicando um curto prazo de centrifugação com uma força centrípeta relativamente alta (2400×g durante 3 min) para a minimização de danos após criopreservação.

Uma alternativa para o processo de centrifugação seria a realização de diálise, removendo componentes de baixo peso molecular, como íons livres e metabólitos, que poderiam ter um efeito negativo na função do esperma, mas sem perder proteínas ou componentes de interação presentes no plasma seminal capazes de promover uma melhor sustentação a criopreservação (Fraser et al., 2007), contudo a diálise ainda é pouco utilizada.

Após a remoção do plasma seminal, o *pellet* de espermatozoides concentrados devido a centrifugação é resuspenso em diluentes de resfriamento e congelamento, ajustando desta forma a concentração de células espermáticas de  $10^6$  a  $10^9$  espermatozoides/mL, além de fornecer nutrientes para a sustentação do metabolismo celular e componentes que irão auxiliar na crioproteção.

Com relação à velocidade de congelamento, com objetivo de diminuir os danos tóxicos dos diluentes internos utilizados, os sistemas convencionais preveem curvas rápidas de congelamento, sendo recomendado ser  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e a velocidade de descongelamento de  $1200\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (Johnson et al., 2000). Recipientes criogênicos, estão sendo desenvolvidos com o objetivo de uniformizar o resfriamento e descongelamento (Eriksson et al., 2000), alcançando resultados similares aos obtidos com o congelamento em palhetas de 0,5mL. O envase para criopreservação deve ser efetuado em palhetas de 0,5 mL ou menores; pois, os resultados são superiores a *pellets*, antiga forma de congelamento (Johnson et al., 2000).

Após o descongelamento, Larsson et al. (1976) demonstrou que a adição de 10% de plasma seminal na solução de descongelamento sendo uma alternativa interessante, restaurando a competência da fertilização *in vivo*. Estando relacionado a capacidade do plasma seminal em regular diretamente funções uterinas, como a supressão de células do sistema imunológico, levando à diminuição da inflamação uterina (Rozeboom et al., 1999; Rozeboom et al., 2001).

## **DILUENTES PARA RESFRIAMENTO E CONGELAMENTO**

Os protocolos de rotinas para criopreservação de sêmen suíno são constituídos por duas etapas utilizando a gema de ovo como diluente básico (Das & Rajkonwar, 1995). Primeiramente o sêmen é resfriado em diluente a base de gema de ovo até a temperatura de  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e posteriormente dilui-se com um extensor contendo crioprotetor interno. Essa metodologia é aplicada com o objetivo de diminuir o tempo de exposição da célula espermática ao crioprotetor interno, reduzindo a toxicidade deste (Medeiros et al., 2002).

Os ingredientes básicos para a confecção dos diluentes são os mesmos que os utilizados há 35 anos, incluindo açúcares, glicerol e a gema de ovo (Barbas & Mascarenhas, 2009). Os açúcares são substâncias de grande importância na criopreservação, pois além de atuarem como substrato energético para as células (Corcuera et al, 2007; Malo et al, 2010a) criam uma pressão osmótica externa, induzindo a desidratação celular e diminuindo a formação de gelo intracelular, preservando a membrana plasmática (Fuller, 2004).

A lactose é o açúcar mais utilizado para criopreservação de sêmen suíno, devido aos bons resultados relatados (Sancho et al. 2007; De Mercado et al, 2010;. Buranaamnuay et al, 2011). No entanto, outros estudos mostram que dissacarídeos de forma geral, que incorporam glicose na sua composição (lactose, sacarose, trealose e melobiose) têm efeito crioprotetor maior do que monossacarídeos (glucose e frutose) (Malo et al, 2010a; De Mercado et al., 2010), evidenciando que esses tipos de açúcares adaptam-se melhor com a célula espermática suína, mantendo a integridade estrutural e propriedades de permeabilidade das bicamadas lipídicas.

Com relação ao crioprotetor interno, ou seja, permeável à membrana plasmática, o glicerol é o mais utilizado, desidratando e reduzindo o ponto crioscópico do interior das células, dificultando a formação de cristais de gelo intracelular (Watson, 1995). O glicerol é utilizado em concentrações baixas (inferiores a 4%), pois apresenta uma potencial ação de toxicidade ao ser metabolizado como fonte de açúcar pela célula (O' she, et al., 1979), sendo responsável pela produção de metilglioxal, por exemplo - mediador da ativação de

fosfolípases e proteases provocando irreversíveis danos na célula (Riddle et al., 1978; Jones et al., 1992).

Buhr et al. (2001) mostraram que nenhuma concentração de glicerol maximiza os parâmetros funcionais do espermatozoide criopreservado. Desta forma busca-se encontrar crioprotetores para a substituição do glicerol, a exemplo disso, a trealose (Hu et al., 2009; Gutiérrez-Pérez et al., 2010) e a dimetilacetamida (Bianchi et al., 2007) mostram resultados promissores, sugerindo desta forma sua utilização.

A gema de ovo é o crioprotetor externo mais utilizado em protocolos de congelamento de forma geral, fornecendo proteção contra choque frio para os espermatozoides especialmente abaixo de 15 °C (Westendorf et al., 1975), devido a sua constituição de lipoproteínas de baixas densidades capazes de associar-se a membrana plasmática, diminuindo a perda de fosfolipídios e colesterol (Bergeron et al., 2004). O seu efeito protetor pode ser melhorado pela adição de Orvus Es Past (OEP), também conhecido como Stm Equex (Nova Chemical, Scituate, MA), detergente sintético baseado em sódio e laurilsulfato de trietanolamina. Tem sido sugerido que a OEP dá proteção, pois modifica os constituintes da gema de ovo no diluente (Strzezek et al, 1984; Pursel et al, 1978).

No entanto, por ser a gema de ovo produto de origem animal, é propensa a uma variação em sua composição dependente do animal, origem e nutrição (Braga et al., 2005; Houpalathi et al., 2007). Muitos estudos buscam o preparo de meios quimicamente definidos para sua substituição, a exemplo das lecitinas de soja (Hiwasa et al., 2009), trealose e glicina

(Valente et al. 2010) ou ainda da própria lipoproteína de baixa densidade purificada (Jiang et al., 2007), contudo nenhum dos materiais testados demonstrou melhores resultados do que o obtido com a gema de ovo.

## **ANTIOXIDANTES**

A célula espermática suína está propensa à ação de agentes oxidantes devido a sua estrutura rica em ácidos graxos poliinsaturados. A geração excessiva dessas substâncias acarreta em mudanças nas características do esperma e causa danos proteicos e estruturais (Davies, 1987). Devido ao baixo poder antioxidante do plasma seminal suíno torna interessante compor diluentes utilizando antioxidantes externos (Zhang et al., 2012).

Bilodeau et al. (2000) sugeriram que um fator importante para a sobrevivência e funcionalidade da célula espermática, durante todo processo de congelamento e descongelamento é o balanço entre a produção de EROs e sua desintoxicação, fato que exerce influência direta sobre a fertilidade.

Assim, nos últimos anos, a investigação sobre a aplicação de antioxidantes para melhorar a criopreservação do esperma suíno e melhorar a qualidade pós-resfriamento e pós-descongelamento tem sido desenvolvida. Dentre os antioxidantes já relatados, podemos citar a glutatona (Gadea et al., 2004), ácido ascórbico (Pena et al., 2003,2004) e L-glutamina e L-cisteína (Funahashi & Sano, 2005; Kaeoket et al. 2010). Todos esses compostos

apresentaram um efeito positivo, aumentando a sobrevivência do espermatozoide, integridade acrossomal e de membrana plasmática.

O uso de antioxidantes naturais também tem sido o objetivo de investigações, dada à sinergia dos compostos ativos presentes - tais como ácido rosmaínico, ácido carnósico, rosmanol, flavonóides e polifenóis. Recentemente foi relatado o uso de extrato de *Rhodiola* (planta da família *Crassulaceae* encontrada em regiões frias) e de Alecrim (planta da família *Baccharis*), melhorando além das características espermáticas, as taxas de penetração espermática e clivagem dos embriões resultantes (Zhao et al., 2009 Malo et al., 2010b, 2011).

## **CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

Devido aos baixos índices de concepção, resultantes de inseminações artificiais com doses criopreservadas, o uso do sêmen suíno congelado ainda não é uma realidade comercialmente. Mas os recentes avanços acerca de conhecimentos bioquímicos e fisiológicos da célula espermática têm possibilitado adaptações em diluentes e a adição de adjuvantes como antioxidantes de forma promissora. Desse modo, acredita-se que essa tecnologia se tornará comercialmente viável em pouco tempo, aumentando a produtividade do rebanho comercial, auxiliando na manutenção de biossegurança e incentivando o intercâmbio internacional de material genético.

**REFERÊNCIAS**

A.R. JONES, L.; CHANTRIL, A.; COKINAKIS. Metabolism of glycerol by mature boar spermatozoa, *Journal of Reproduction and Fertility*. v. 94, p. 129–134, 1992.

ABEYDEERA, L.R.; JOHNSON L.A.; WELCH, G.R.; WANG, W.H.; BOQUEST, A.C.; CANTLEY, T.C.; RIEKE, A.; DAY, B.N. Birth of piglets preselected for gender following in vitro fertilization of in vitro matured pig oocytes by X and Y chromosome bearing spermatozoa sorted by high speed flow cytometry. *Theriogenology*, v.50, p 981–988, 1998.

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

BARBAS, J.P.; MASCARENHAS, R.D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank* v.10, p. 49–62. 2009.

BERGERON, A; CRÊTE, M.H.; BRINDLE, Y.; MANJUNATH, P. Low-density lipoprotein fraction from hen`s egg yolk decreases the binding of the major protein of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biology Reproduction* v.70, p.708-717, 2004.

BHUR M.; FISER, P.; BAILEY, J.; CURTIS, E. Cryopreservation in different concentrations of glycerol alters boar sperm and their membranes, *Journal of Andrology*, v.22, p.961–969, 2001.

BIANCHI, I.; CALDERAM, K.; MASCHIO, É.F.; MADEIRA, E.M.; ULGUIM, R. DA ROSA.; CORCINI, C.D.; BONGALHARDO, D.C.; CORRÊA, É.K.; JR, T. LUCIA; DESCHAMPS, J.C.; CORRÊA, M.N. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. *Theriogenology*, v.69, p.632-638, 2007.

BILODEAU, J.F.; SUVRO-CHATTERJEE; SIRARD, M.A. Levels of antioxidant defenses are decrease in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular Reproduction and Development*, v. 55, p. 282-288, 2000.

BRAGA, C.V.P.; FUENTES, M.F.F.; FREITAS, E.R.; CARVALHO, L.E.; SOUSA, F.M.; BASTOS, S.C. Efeito da inclusão do farelo de coco em rações para poedeiras comerciais *Revista Brasileira de Zootecnia.* , v.34, p.76-80, 2005.

BREZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; SLEBODZINSKI, A.B.; PIETRAS, B.; WIECZOREK, G. Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. *Biological Trace Element Research.* v.47, p.69–74. 1995.

BUHR,M.M.; FISER, P.; BAILEY, J.L.; CURTIS, E.F. Cryopreservation in different concentrations of glycerol alters boar sperm and their membranes. *Journal of Andrology*, v.22, p.961–969. 2001.

BURANAAMNUAY, K.; GROSSFELD, R.; STRUCKMANN, C.; RATH, D. Influence of cryoprotectants glycerol and amides, combined with antioxidants on quality of frozen-thawed boar sperm. *Animal Reproduction. Science*, v 127, p.56–61, 2011.

CARVAJAL, G.; CUELLO, C.; VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; ROCA, J. Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryopreservation. *Journal of Andrology*, v.25, p.389–396. 2004.

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.

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.



CORCUERA, B.D.; MARIGORTA, P.; SAGÜÉS, A.; SAIZ-CIDONCHA, F.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, J.F. Effect of lactose and glycerol on the motility, normal apical ridge, chromatin condensation and chromatin stability of frozen boar spermatozoa. *Theriogenology*, v. 67, p.1150–1157, 2007.

DAS, K. K.; RAJKONWAR, C. K. Effect on the motility of buck semen during freezing with lactose egg yolk glycerol extender. *International Journal of Animal Science*, v.10, p.127-128, 1995.

DE MERCADO, E.; RODRÍGUEZ, A.; GÓMEZ, E.; SANZ, E. Cryopreservation of Iberian pig spermatozoa. Comparison of different freezing extenders based on post-thaw sperm quality. *Animal Reproduction Science*, v.118, p.54–61, 2010.

ERIKSSON, B.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in FlatPacks and Maxi-straws. *Animal Reproduction Science*, v.63, p. 205–220, 2000.

FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiology*, v.3, p.1-13, 1996.

FRASER, L.; DZIEKOŃSKA, A.; STRZEŻEK, R.; STRZEŻEK, J. Dialysis of boar semen prior to freezing–thawing: Its effects on post-thaw sperm characteristics. *Theriogenology*, v.15, p. 994–1003, 2007.

FULLER, B.J.,. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo Letters*, v. 25, p. 375–388, 2004

FUNAHASHI, H.; SANO, T. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 °C. *Theriogenology*, v.63, p.1605–1616, 2005.

GADEA, J.; SELLS, E.; MARCO, M.A.; COY, P.; MATAS, C.; ROMAR, R.; RUIZ, S. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation: effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extends. *Theriogenology* v.62, p.690–701, 2004.

GROSSFELD, R.; KLINC, P.; SIEG, B.; RATH D. Production of piglets with sexed semen employing a non-surgical insemination technique. *Theriogenology* v.63, p.2269–77, 2005.

GROSSFELD, R.; SIEG, B.; STRUCKMANN, C.; FRENZEL, A.; MAXWELL, W.M.; RATH, D. New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology* v.70, p.1225–1233, 2008.

GUTIÉRREZ-PÉREZ, O.; JUÁREZ-MOSQUEDA, M.L.; CARVAJAL, S.U.; ORTEGA, M.E.T. Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity, *Cryobiology*, v.58, p. 287–292, 2009.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology*, v.29, p.26-28, 1992.

HAMMERSTEDT, RH.; GRAHAM, JK.; NOLAN, P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*, v. 11, p.73–88, 1990.

HIWASA, M.; KOHNO, H.; TOGARI, T.; OKABE, K.; FUKU, I Y. Fertility after different artificial insemination methods using a synthetic semen extender in sheep. *Journal of Reproduction and Development*, v.55, p.50-54, 2009.

HOLT, WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*. v. 62, p.3–22, 2000.

HOLT, WV.; MEDRANO, A.; THURSTON, LM.; WATSON PF. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology* v.63, p.370–382, 2005.

HOUPALATHI, R.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; ANTON, M.; SCHADE, R. Bioactive egg compounds. New York: Springer- Verlag, p. 296. 2007.

J.H. HU.; Q.W. LI; G. LI; Z.L. JIANG; S. BU, H. YANG; L.Q. WANG. The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality, *Animal Reproduction Science* v.112, p.107–118, 2009.

JIANG ZL; LI QW; HU JH; LI WY; ZHAO HW; ZHANG SS. Improvement of the quality of boar cryopreservation semen by supplementing with low density lipoprotein in diluents. *Cryobiology* .v. 3, p.301-304, 2007.

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

DAVIES, K.J.. Protein damage and degradation by oxygen radicals I. General aspects. *Journal Biology Chemistry*. V.262, p. 9895–990, 1987.

KAEOKET, K.; CHANAPIWAT, P.; TUMMARUK, P.; TECHAKUMPHU, M. Supplemental effect of varying l-cysteine concentration on the quality of cryopreserved boar semen. *Asian Journal Andrology*. v.12, p.760–765, 2010.

KAMARUDDIN, M.; KROETSCH, T.; BASRUR, P.K.; HANSEN, P.J.; KING, W.A.. Immunolocalization of heat shock protein 70 in bovine spermatozoa, *Andrologia* v.36, p. 327–334, 2004.

KATKOW, I.I.; MAZUR, P. Influence of centrifugation regimes on motility, yield and cell associations of mouse spermatozoa. *Journal of. Andrology*, v. 19, p. 232–241, 1998.

KAWANO, N.; SHIMADA, M.; TERADA, T. Motility and penetration competence of frozen- hawed miniature pig spermatozoa are substantially altered by exposure to seminal plasma before freezing. *Theriogenology*, v.61, p.351–364, 2004.

LADHA S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. *Journal of Membrane Biology*, v.165, p.1-10, 1998.

LARSSON K. Deep freezing of boar semen. Uppsala, Sweden: Swedish University of Agricultural Science; p. 199–222. 1985.

LARSSON, K. Fertility of deep frozen boar spermatozoa at various intervals between insemination and induced ovulation: influence of boars and thawing diluents. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.17, p.63–73, 1976.

MACEDO JR., M.C.; DESCHAMPS, J.C.; LUCIA JR., T.; BORDIGNON, J.; SERRET, C.G.; RAMBO, G.; PIVATO, I.; SCHMITT, E. In vitro penetration of fresh and vitrified swine oocytes by homologous spermatozoa using different incubation systems. *Animal Reproduction Science*. v. 92, p. 334–348, 2006.

MALO, C.; GIL, L.; CANO, R.; MARTINEZ, F.; GALE, I. Antioxidant effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on boar epididymal spermatozoa during cryopreservation. *Theriogenology* v.75, p. 1735–1741, 2011.

MALO, C.; GIL, L.; GONZALEZ, N.; CANO, R.; DE BLAS, I.; ESPINOSA, E. Comparing sugar type supplementation for cryopreservation of boar semen in egg yolk based extender. *Cryobiology* v.61, p. 17–21, 2010a.

MALO, C.; GIL, L.; GONZALEZ, N.; MARTINEZ, F.; CANO, R.; DE BLAS, I.; ESPINOSA, E. Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Cryobiology* v.61, p.142–147, 2010b.

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

MOORE A.I.; SQUIRES E.L. & GRAHAM J.K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology*.v. 63, p. 2372-2381, 2005.

OKAZAKI, T.; ABE, S.; YOSHID, S.; SHIMADA, M. Seminal plasma damages sperm during cryopreservation, but its presence during thawing improves semen quality and conception rates in boars with poor post-thaw semen quality. *Theriogenology* v.71, p.491–498, 2009.

PENA, F.J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRIQUEZ MARTINEZ, H. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane peteitial after cryopreservation of different fractions the ejaculate. *Animal Reproduction Science*. v.78, p. 85–98, 2003.

PENA, F.J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRIQUEZ MARTINEZ, H. Antioxidant supplementation of boar spermatozoa from different fractions of the ejaculate improves cryopreservation: changes in sperm membrane lipid architecture. *Zygote*, v.12, p.117–124, 2004.

PURDY P.H. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research Journal*, v.63, p.215-225, 2006.

PURSEL, V.G.; SCHULMAN, L.L.; JOHNSON, L.A. Effect of Orvus ES Paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen–thawed boar sperm. *Journal Animal Science*. v. 47, p. 198–202, 1978.

RIDDLE, V.M.; LORENZ, F.W. Nonenzimatic formation of toxic levels of methylglyoxal from glycerol and dihydroxiacetone in Ringer’s phosphate suspension of avian spermatozoa. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. V. 50, p. 27–34, 1973.

RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; MAES, D.; DE KRUIF, A. Effect of centrifugation on in vivo survival of fresh diluted canine spermatozoa. *Theriogenology* v.57, p.1669–1681, 2002.

ROCA, J.; CARVAJAL, G.; LUCAS, X.; VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A. Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology* v.60, p.77–87, 2003.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; SARAIVA, F.; WALLGREN, M.; ROCA, J.; PEÑA, F.J. Influence of seminal plasma on the kinematics of boar spermatozoa during freezing. *Theriogenology* v.70, p.1242–1250, 2008.

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

ROZEBOOM, KJ.; TROEDSSON, MH.; MORITOR, TW.; CRABO, BG. The effect of spermatozoa and seminal plasma on leukocyte migration into the uterus of gilts. *Journal Animal Science*; v,77, p.2201-2206, 1999.

ROZEBOOM, KJ; ROCHA-CHAVEZ, G.; TROEDSSON, MH. Inhibition of neutrophil chemotaxis by pig seminal plasma in vitro: a potential method for modulating post-breeding inflammation in sows. *Reproduction* v,121, p. 567–72, 2001.

SANCHO, S.; CASAS, I.; EKWALL, H.; SARAIVIA, F.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; RODRIGUEZ-GIL, J.; FLORES, E.; PINART, E.; BRIZ, M.; GARCÍA-GIL, N.; BASSOLS, J.; PRUNEDA, A.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; BONET, S. Effects of cryopreservation on semen quality and the expression of sperm membrane hexose transporters in the spermatozoa of Iberian pigs. *Reproduction* v.134, p. 111–121, 2007.

SARAIVIA, F.; WALLGREN, M.; JOHANNISSON, A.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; PEÑA, F.J.; ROCA, J.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Exposure to the seminal plasma of different portions of the boar ejaculate modulates the survival of spermatozoa cryopreserved in MiniFlatPacks. *Theriogenology* v.71, p. 662–675, 2009.

SARAIVIA, F.; WALLGREN, M.; NAGY, S.; JOHANNISSON, A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Deep freezing of concentrated boar semen for intrauterine insemination: effects on sperm viability. *Theriogenology* v. 63, p.1320–1333, 2005.

SHE, T.O.; DACHEAUX, J.L.; PAQUIGNON, M. Metabolism of boar spermatozoa before, during preparation for, and after storage in liquid nitrogen. *Journal of Reproduction & Fertility*. V.55, p.277–285, 1979.

SIQUEIRA, A.P.; WALLGREN, M.; HOSSAIN, M.S.; JOHANNISSON, A.; SANZ, L.; CALVETE, J.J.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Quality of boar spermatozoa from the sperm-peak portion of the ejaculate after simplified freezing in Mini- Flatpacks compared to the remaining spermatozoa of the sperm-rich fraction. *Theriogenology* v. 75, p.1175–1184, 2011.

STRZEZEK, J.; GLOGOWSKI, J.; MAGIERKA, E.; LUBERA, Z.; JABBONOSVSKA, C. Some aspects of cryobiochemistry of boar semen. *Proc. 10th International Congress on Animal Reproduction*. A.I., Urbana, IL 2, 224, 1984.

TAVILANI, H.; GOODARZI, M.T.; DOOSTI, M.; VAISI-RAYGANI, A.; HASSANZADEH, T.; SALIMI, S.; JOSHAGHANI, H.R. Relationship between seminal antioxidant enzymes and the phospholipid and fatty acid composition of spermatozoa. *Reproductive BioMedicine*. Online v. 16, p.649–656, 2008.

VALENTE, SS; PEREIRA, R.M.; BAPTISTA, M.C.; MARQUES, C.C.; VASQUES, M.I.; SILVA, PEREIRA M.V.C.; HORTA, A.E.M.; BARBAS, J.P. In vitro and in vivo fertility of ram semen cryopreserved in different extenders. *Animal Reproduction Science*, v.117, p.74-77, 2010.

WATSON P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v.60/61, p.481-492, 2000.

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

WATSON, PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. v, 60/61, p.481–92, 2000.

WESTENDORF, P.; RICHTER, L.; TREU, H. Zur Tiefgefrierung von Ebersperma: Labor- und besamungsergebnisse mit dem hülsenberger pailletten-verfahren. *Dtsch Tierarztl Wschr*. V.82, p.261-267, 1975.

ZHAO, H.W.; LI, Q.W.; NING, G.Z.; HAN, Z.A.; JIANG, Z.L.; DUAN, Y.F. Rhodiola sacra aqueous extract (RSAE) improves biochemical and sperm characteristics in cryopreserved boar semen. *Theriogenology* v.5, p. 849–857, 2009.

### **3. OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos *in vitro* da adição de extrato de própolis sobre os espermatozoides suínos criopreservados.

### **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar a concentração ideal de extrato de própolis no diluente de congelamento de sêmen suíno;
2. Avaliar a ação antioxidante do extrato de própolis nas células espermática de suínos.

### **5. MATERIAIS E METODOS**

#### **5.1 Preparo do extrato de própolis verde**

Alíquotas do própolis (30 g), obtidas a partir de coleta ambiental, na região da cidade de Pelotas, RS, Brasil, foram congeladas, maceradas e armazenadas em



cartucho de papel de filtro. Para extração, as mesmas foram submetidas a tratamento de Soxhlet com 250 mL de metanol. A extração foi efetuada a 50 °C durante 8h, e a cera separada por precipitação a frio. O sobrenadante foi evaporado em um roto-evaporador na temperatura de 40 °C para obtenção do própolis verde sem extrato de álcool metanólico. Posteriormente o extrato foi dissolvido numa quantidade mínima de etanol e fracionado por cromatografia de filtração em gel em uma coluna de Sephadex LH-20 (Amersham Pharmacia, G e E, EUA) em seis partes designadas como O, Q, U, J, A e I. As seis frações recolhidas foram injetadas no aparelho de cromatografia líquida (L-7100, Merck-Hitachi, Darmstadt, Alemanha) conforme protocolo de Fischer et al. (2010). As condições cromatográficas foram Lichrochat 100 coluna de fase reversa RP-18 (12,5 x 0,4 cm, diâmetro de partícula de 5 ¼ m) (Merck, Darmstadt, Alemanha) e ácido fórmico água-ácido (95:5, solvente A) e metanol (solvente B) para a fase móvel. O tempo de análise foi de 50 min e a detecção realizada com comprimento de onda de 280 e 340 nm. O software utilizado para a análise dos dados foi o Modelo D-7100 Merck-Hitachi Cromatografia de dados da estação-DAD Manager (Darmstadt, Alemanha).

## **5.2 Coleta de sêmen**

Foram utilizados um total de 20 ejaculados de machos distintos, pertencentes à Cooperativa Languiru, instalados na cidade de Teutônia, Rio Grande do Sul, Brasil.

Todos os machos foram manejados sob as mesmas condições ambientais e sanitárias, sendo arraçoados duas vezes ao dia.

Os ejaculados foram coletados através do método da mão enluvada, utilizando frascos de 10 mL aquecidos a 38 °C e cobertos com filtro, a fim de separar a fração gelatinosa do sêmen (HANCOCK & HOVEL, 1959).

### **5.3 Processamento do ejaculado e criopreservação**

Imediatamente após a coleta, o ejaculado foi diluído em condições isotérmicas (1:1 v/v) no diluente *Beltsville Thawing 110 Solution* (BTS) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO – EUA).

Posteriormente, as amostras foram encaminhadas, sob temperatura controlada, para o Laboratório de Reprodução Animal – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil), num período máximo de 6h, para continuação do processamento. O sêmen fresco foi avaliado quanto à motilidade espermática, integridade de membrana, integridade de acrossoma e funcionalidade mitocondrial. Para serem processados, os ejaculados deveriam apresentar, após a diluição com BTS, motilidade espermática igual ou superior a 60%, assegurando uma qualidade mínima do ejaculado.

As amostras foram centrifugadas por 10min a 800xg para remoção do BTS e o *pellet* foi resuspenso no diluente de resfriamento (DR), contendo 80% (v/v) de solução de lactose a 11% (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO - USA) e 20% gema de ovo (v/v), obtidos na colônia da cidade de Pelotas, RS, Brasil. Para a confecção dos tratamentos o extrato de própolis (20 mg/mL) foi adicionado ao DR para concentrações finais de 0,05, 0,1, 0,15 e 0,2% de própolis e para uma concentração celular de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Após, foi realizado resfriamento até 5 °C por 90min em geladeira.

Ao final deste período, o meio foi resuspenso no diluente de congelamento (DC) - 83,5% de DR, 1,5% de *Orvus Ex Paste* (Equex-Paste®, Nova Chemical Sales, MA - USA) e 15% do crioprotetor N, N Dimetilacetamida ( $C_4H_9NO$ ) v/v (DMA, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). A quantidade de DC acrescentada foi de 1:2, para obtenção de uma concentração final de 5% de DMA (BIANCHI et al, 2008).

Posteriormente, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 mL. As palhetas foram congeladas horizontalmente, em vapor de nitrogênio líquido, 5 cm acima do nível do nitrogênio, a uma temperatura aproximada de -90 °C, por 10min, para estabilização. Após esse período, as palhetas foram submersas em nitrogênio líquido a -196 °C e armazenadas até o descongelamento em botijão de nitrogênio.

Para as avaliações pós-descongelamento, as palhetas referentes a cada tratamento foram descongeladas a 37 °C por 30s em banho-maria, sendo resuspensas em tubo cônico contendo 2,5 mL de BTS previamente aquecido a 37°C (1:10, v/v).

#### **5.4 Avaliações *in vitro* de qualidade espermática**

Além das avaliações a fresco, após o descongelamento, foram realizadas as avaliações de qualidade seminal correspondentes a motilidade espermática, integridade de membrana, integridade de acrossoma, integridade de DNA, funcionalidade de mitocôndria, penetração oocitária e as avaliações bioquímicas de quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e capacidade antioxidante total.

**5.4.1 Motilidade espermática:** uma alíquota de 20 µl sêmen foi avaliada com visualização em microscopia óptica com placa aquecida com aumento de 200x, por um mesmo avaliador treinado, em uma lâmina coberta por lamínula, ambas previamente aquecidas a 37 °C (CBRA, 1998).

Nas avaliações de integridade da membrana, acrossoma, DNA e da funcionalidade mitocondrial foram avaliadas 100 células espermáticas por lâmina.

**5.4.2 Integridade de membrana plasmática:** Avaliação conforme protocolo descrito por Harrison e Vickers (1990) com modificações. Uma alíquota de 20 µl foi exposta à combinação das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) (C4916-25mg, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) e Iodeto de Propídio (IP) (P4170-1g, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) em solução com formaldeído e citrato de sódio, e encubação por 5min em sala escura. Esta avaliação foi feita com aumento de 400x em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC, São Paulo, SP), utilizando filtro WU com excitações de 450-490 nm e emissão de 516-617 nm. As células que apresentavam fluorescência verde foram consideradas íntegras, enquanto as células com fluorescência vermelha ou verde/vermelha foram consideradas lesadas.

**5.4.3 Integridade de acrossoma:** Confeccionou-se um esfregaço contendo 20 µL de cada amostra e armazenadas para análise posterior. A partir dessas amostras em cada lâmina colocou-se 20 µL de uma solução de IP, e depois de secas, as lâminas foram submersas em álcool etílico absoluto (459844-1L, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) por 5min, e de lavadas em PBS (*Phosphate Buffer Saline*). Em uma sala escura, adicionaram-se às amostras, por 10min, 20 µL do Conjugado de Lectina de *Arachis hypogaea* - FITC (20 mg/mL)

(L7381-1mg, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água deionizada e drenadas, conforme protocolo descrito por Roth et al. (1998) com modificações. As lâminas cobertas por lamínula e óleo de imersão foram avaliadas em aumento de 1000 x, em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC, São Paulo, SP), em filtro WU com excitações de 450-490 nm e emissão de 516-617 nm. Foram consideradas células com acrossomas íntegros aquelas que apresentavam fluorescência verde no acrossoma e com morfologia normal. Quando a coloração verde não era aparente ou quando a morfologia acrossômica estava anormal, foi considerado reagido (KAWAMOTO et al., 1999).

**5.4.4 Integridade de DNA:** Foi avaliada através da sonda Acridine Orange (A6014, Sigma) com protocolo adaptado de Evenson et al. (1999). Em uma alíquota de 20 µL de sêmen colocou-se 10 µL de TNE (0,01 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,001 M EDTA; pH 7,2), após 30 segundos adicionou-se 100 µL de Triton 1x e passado 30 segundos, adicionou-se 50 µL de Acridine Orange (2 mg/mL em H<sub>2</sub>O deionizada). Após 5min de encubação, a lâmina sobre lamínula foi montada, não ultrapassando 1min de exposição antes da leitura. Foram consideradas células com DNA normal (bicatenário) aquelas que apresentavam fluorescência verde e quando a célula apresentava coloração vermelha ou amarelada foi considerado DNA desnaturado

(monocatenário). As avaliações foram executadas em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC, São Paulo - Brasil) sob aumento de 400x com excitação em 490 nm e com filtro de 530 nm.

**5.4.5 Funcionalidade mitocondrial:** Foi avaliada com o uso de uma sonda específica, Rodamina 123 (Rh123) (R8004-5mg, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, 23 USA), juntamente com IP, conforme Garner et al. (1997). Uma alíquota de 20 µL do sêmen foi adicionado em uma solução contendo formaldeído, IP, Rh123 e citrato de sódio, e incubado a 37 °C por 5 min, em sala escura. As células foram avaliadas em aumento de 400x em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC, São Paulo, SP), em filtro WU com excitações de 450-490 nm e emissão de 516–617 nm. As células que apresentavam a peça intermediária com uma intensa fluorescência verde foram consideradas com mitocôndrias integras (funcionalmente ativas), enquanto as células sem ou com pouca intensidade de fluorescência verde na peça intermediária foram consideradas não funcionais.

**5.4.6 Teste de penetração oocitária:** Foram utilizados oócitos de ovários de porcas pré-puberes coletados em um frigorífico local. Os ovários foram acondicionados em uma garrafa isotérmica com solução salina (0,85%), suplementado com gentamicina (40 mg/L), a 39 °C e transportados ao laboratório –

sendo puncionados com auxílio de um aparelho de vácuo (aspira Max). O material obtido das punções foi colocado em um tubo cônico de 15 mL, e congelado a -18 °C. Para a realização do teste conforme Corcini et al. (2012), 30 oócitos foram selecionados, com auxílio de uma lupa estereomicroscópica e desnudados mecanicamente. Para co-incubação oócitos-espermatozoides, 200 µL de sêmen foi adicionado junto aos oócitos em meio mTBM (Meio Tamponado com Tris Modificado) suplementado com lactato de cálcio, cafeína e albumina sérica bovina, em banho-maria a 37 °C por 2 horas. Após a incubação, os complexos oócitos-espermatozoides foram retirados com auxílio de uma micropipeta e colocados em uma placa de Petri; os oócitos foram transferidos para um tubo tipo *ependorf* com PBS1% e submetidos a 20 pipetagens com o objetivo de retirar os espermatozoides acessórios. Para a verificação da penetração oócito-espermatozoide, os oócitos foram expostos à solução de Hoescht 33342 (10 µg/mL) (Sigma®) e incubados em estufa por 10min a 38,5 °C.

Para avaliação, as lâminas foram montadas de forma a evitar o rompimento dos oócitos e visualizadas em microscópio de epifluorescência no aumento de 200X. Foi avaliado o número de espermatozoides por oócito e o número de oócitos penetrados (taxa de penetração).



## 5.5 Avaliações bioquímicas

**5.5.1 Teste de cinética ERO:** Foi realizado a partir de protocolo modificado de Myhre & Fonnum (2001), através de um fluorímetro (Victor 2, Perkin Elmer). Após o descongelamento do sêmen em banho-maria a 36 °C durante 30 s, 500 µL de cada amostras foi homogeneizada em PBS em tubo tipo *ependorfs* de 1,5 mL e centrifugado uma vez a 800xg por 10 min. O sobrenadante foi descartado e realizou-se a resuspensão do *pellet* em 600 µL do preparo da sonda fluorescente 2'7'Diacetato de Diclorofluoresceína H<sub>2</sub>DCF-DA (40µM em PBS) (35845-1g, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). Após a homogeneização, as amostras permaneceram em incubação com a sonda por 30min a 36 °C. Para leitura em fluorímetro, foram colocadas 160 µl de cada amostra, em triplicatas, em placas brancas de 96 poços (Corning 3912). A leitura foi realizada em 8 ciclos com intervalo de 4min e agitação de 2s antes e depois de cada ciclo em uma temperatura de 36 °C. A fluorescência foi mensurada através do fluorímetro usando comprimentos de onda de excitação de 488nm e um comprimento de onda de emissão de 529 nm. Sendo a geração de EROs determinada através da integração da área da curva de fluorescência pelo tempo. Os resultados foram expressos por  $UF \times 10^7$ .

**5.5.2 Capacidade antioxidante total (TOSC):** Foi mensurada contra os radicais peróxidos, gerados pela decomposição térmica a 36 °C, de 2,2' –azobis (2-metilpropionamidina) dihidrocloro (ABAP), segundo AMADO et al. (2009). Para a

realização do protocolo, uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  do sêmen descongelado foi armazenada a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  por no máximo 15 dias para posterior análise. No momento da análise, a alíquota foi descongelada a temperatura ambiente e sonicada por 5 s e, em seguida, centrifugada a 800xg por 10min, sendo o pellet desprezado. Em uma placa de 96 poços (Corning 3912) foi adicionado 125  $\mu\text{L}$  de tampão de reação (PBS), sendo acrescentado uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  de cada amostra em 4 poços. Em dois poços foram acrescentados 7,5  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q e nos outros dois, 7,5  $\mu\text{L}$  de solução de ABAP (20  $\mu\text{M}$ ), sendo as amostras feitas em duplicatas. Em seguida foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de solução da sonda H2DCF-DA (16  $\mu\text{M}$ ) em todos os poços para leitura em fluorímetro durante 30min com intervalo de 5min em temperatura controlada de  $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ , usando comprimentos de onda de excitação de 488 nm e um comprimento de onda de emissão de 529 nm.

## **5.6 Análise estatística**

Todas as análises estatísticas foram conduzidas com o programa STATISTIX®9 (2008). Em função de não apresentarem distribuição normal, de acordo com o teste de Shapiro-Wilk, foi conduzida análise de variância para todas variáveis pelo teste de Kruskal-Wallis.

## 6. RESULTADOS

Na tab.1 está descrito os compostos presentes no extrato de própolis utilizado neste trabalho, após cromatografia. Demonstrando os teores dos principais ácidos fenólicos presentes na amostra.

Tabela 1: Concentração de compostos fenólicos presentes na amostra de própolis utilizada.

<b>Composto</b>	<b>Concentração (mg/g)</b>
Ácido p-cumárico	4,673
Ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico	1,951
Canferide	5,623
Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico	16,322
Derivado do ácido cinâmico	6,692
Ácido 6-propenóico-2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano	0,163

Para o sêmen descongelado, em nenhuma das variáveis analisadas houve diferenças estatística entre os diferentes tratamentos contendo extrato de própolis e o controle (Tab. 2, 3 e 4)

Tabela 2: Motilidade espermática (MOT), integridade da membrana (MEM) e do acrossoma (ACRO) e funcionalidade mitocondrial (MIT), a fresco e após o descongelamento de sêmen suíno com diluente incluindo diferentes concentrações de própolis (médias  $\pm$  EPM)\* – expresso em porcentagem.

<b>TRATAMENTO</b>	<b>MOT</b>	<b>MEM</b>	<b>ACRO</b>	<b>MIT</b>
<b>Controle</b>	21.6 $\pm$ 3.2	54.4 $\pm$ 6.9	8.7 $\pm$ 1.7	39.0 $\pm$ 5.3
<b>0,05%</b>	14.7 $\pm$ 2.2	41.2 $\pm$ 7.5	8.3 $\pm$ 1.4	47.2 $\pm$ 6.0
<b>0,10%</b>	17.9 $\pm$ 1.9	46.7 $\pm$ 7.9	6.1 $\pm$ 1.6	39.8 $\pm$ 6.2
<b>0,15%</b>	12.8 $\pm$ 2.3	48.1 $\pm$ 7.0	5.9 $\pm$ 1.3	34.5 $\pm$ 6.6
<b>0,20%</b>	13.9 $\pm$ 2.1	48.5 $\pm$ 8.4	10.3 $\pm$ 1.7	52.1 $\pm$ 7.4

Controle: Gema + Lactose 11%

Tabela 3: Integridade de DNA, taxa de penetração espermática (TP) e número de espermatozoide por oócito (ESP), em porcentagem, após o descongelamento de sêmen suíno com diluente incluindo diferentes concentrações de própolis (médias  $\pm$  EPM).

<b>Tratamento</b>	<b>DNA</b>	<b>TP</b>	<b>ESP</b>
<b>Controle</b>	94.7 $\pm$ 3.8	73.2 $\pm$ 5.3	2.4 $\pm$ 0,3
<b>0,05%</b>	94.7 $\pm$ 3.0	75.7 $\pm$ 6.1	3.5 $\pm$ 0,5
<b>0,10%</b>	96.0 $\pm$ 2.7	70.4 $\pm$ 6.8	3.0 $\pm$ 0.6
<b>0,15%</b>	96.9 $\pm$ 2.3	77.1 $\pm$ 4.2	3.2 $\pm$ 0,6
<b>0,20%</b>	98.3 $\pm$ 1.1	71.1 $\pm$ 4.6	2.8 $\pm$ 0.5

Controle: Gema + Lactose 11%;

Tabela 4: Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e capacidade antioxidante total (TOSC) expressa pela área por unidade de fluorescência, após o descongelamento de sêmen suíno com diluente incluindo diferentes concentrações de própolis (médias  $\pm$  EPM).

<b>Tratamento</b>	<b>ERO</b>	<b>TOSC</b>
<b>Controle</b>	$3,2^5 \pm 7,2^4$	$3,1^5 \pm 3,7^4$
<b>0,05%</b>	$1,8^5 \pm 5,7^4$	$1,9^5 \pm 5,1^4$
<b>0,10%</b>	$3,5^5 \pm 3,3^5$	$8,1^5 \pm 5,71^5$
<b>0,15%</b>	$2,3^5 \pm 5,7^4$	$1,9^5 \pm 7,7^4$
<b>0,20%</b>	$2,5^5 \pm 5,5^4$	$1,8^5 \pm 6,9^4$

Controle: Gema + Lactose 11%;

## 7. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo a avaliar o efeito da própolis como componente em diluente seminal suíno com o objetivo de auxiliar no processo de congelamento, bem como avaliar seu potencial antioxidante. A amostra de própolis utilizada apresenta índices de compostos fenólicos e flavonóides compatíveis com outras amostras de própolis brasileiro de outras regiões (CASTRO et al., 2007).

Não foi demonstrada estatisticamente proteção à integridade de acrossoma da célula espermática, contudo é possível notar numericamente um incremento frente ao grupo controle com relação à concentração de 0,2% de própolis. O acrossoma é

uma estrutura essencial para o processo de fertilização (KAWAKAMI et al., 1993), já que está relacionada com o início da reação físico-química do processo. Vários estudos relatam uma correlação positiva entre a porcentagem de acrossomas intactos e a fertilidade (CORREA et al., 1997; SILVA e GADELLA, 2006).

Além disso, nenhuma das concentrações de própolis trouxe uma vantagem na qualidade de integridade de membrana, demonstrando que o extrato não foi capaz de realizar sua estabilização durante o processo, bem como diminuir os danos causados pelo ataque de radicais livres. A avaliação de membranas espermática é um indicador importante do sucesso da criopreservação, uma vez que estas são extremamente sensíveis às crio-injúrias e as responsáveis por garantir a manutenção da homeostase celular, atuando como barreira entre os meios interno e externo (AMMAN & PICKET, 1987).

Nas condições de estresse provocado pela criopreservação, as membranas podem sofrer rearranjos, formando pontos vulneráveis e, com isso, induzir a excessiva permeabilidade ou mesmo rompimento da membrana (AMANN & GRAHAM, 1993), alterando seu estado funcional (HOLT et al., 1992).

Com relação aos processos de motilidade espermática e funcionalidade mitocondrial, nenhuma das concentrações testadas contribuiu para diminuir os danos causados pelo congelamento, corroborando os dados obtidos por Castilho et al. (2009) onde a própolis também foi ineficaz em manter a intensidade dos

movimentos espermáticos. Esses parâmetros estão fortemente relacionados entre si (ESPINOZA et al., 2009), visto que as mitocôndrias presentes na peça intermediária do espermatozoide são as responsáveis pelo fornecimento de energia para a motilidade (GRAVANCE et al., 2000), através da quebra de moléculas de adenosina trifosfatase, produzindo energia na forma de adenosina trifosfato (ATP) (BARTH & OKO, 1989).

Contudo, é notório uma diminuição numérica na motilidade bem como um aumento na funcionalidade mitocondrial com um aumento de concentração de própolis. É possível que as concentrações mais elevadas deste componente atuassem inibindo processos fisiológicos, tais como a capacitação e hiperativação (MALO et al., 2010), hipótese reforçada pela proteção fornecida pelo extrato à integridade acrossomal, mas mais estudos devem ser realizados para esclarecimentos.

As avaliações de integridade de DNA, taxa de penetração oocitária e número de espermatozoide por oócito, avaliações laboratoriais alternativas para categorizar machos férteis, quanto a sua capacidade fecundante, pois mimetizam *in vitro* o que acontece *in vivo* (PAVLOK, 1981) – demonstra que os extratos de própolis nas concentrações testadas não apresentam toxicidade ao espermatozoide suíno, mantendo a qualidade de transmissão de informações genéticas e capacidade fecundante similar ao controle criopreservado.

Outros estudos sobre a determinação do estresse oxidativo e qualidades espermáticas em sêmen de suínos são necessários para entender melhor as mudanças bioquímicas e estruturais que são importantes no congelamento de sêmen, fecundação *in vivo/in vitro* e em sistemas de produção de embriões, visto que neste trabalho, as taxas de penetração espermática encontradas com sêmen congelado mostraram-se similares numericamente a estudos *in vitro* utilizando sêmen resfriado (GADEA et al., 1998; POPWELL et al., 2004; MACEDO JR, 2007).

Além disso, os dados presentes neste trabalho não demonstraram a ação da própolis como antioxidante seminal, levando em consideração as espécies reativas de oxigênio e a capacidade antioxidante total (radicais peroxila, hidroxila e peroxinitrito). Nossos resultados vão de encontro aos resultados apresentados por Russo et al. (2006) que demonstrou a ação antioxidante do própolis em espermatozoides humanos contra espécies reativas de ácido tiobarbitúrico.

Contudo se faz necessário a análise de outras variáveis bioquímicas, como a peroxidação lipídica e a mensuração da atividade de enzimas como a elongase e  $\Delta 6$  dessaturase, pois outra ação do extrato poderia ser sob estruturas membranosas, visto que auxílio na redução dos danos causados ao acrossoma, mesmo que apenas de forma numérica, demonstrando uma possível ação externa do extrato frente as estrutura e/ou à conversão de ácidos graxos poliinsaturados (BEORLEGUI et al. 1997; NAGAI et al., 2003).



## 8. CONCLUSÃO

Não foi encontrada ação antioxidante do extrato de própolis pós-descongelamento de sêmen suíno. Além disso, o extrato não incrementou as qualidades celulares analisadas.

## 9. REFERÊNCIAS

AITKEN, R.J., PATERSON, M., FISHER, H. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in human sperm function. **Journal of Cell Science**, n.108, p. 2017–2025. 1995.

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

AMADO, L.L.; GARCIA, M.L.; RAMOS, P.B.; FREITAS, R.F.; ZAFALON, B.; FERREIRA, J.L.R.; YUNES, J.S.; MONSERRAT, J.M. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. **Science of the Total Environment**, v.407, p. 2115 – 2123, 2009.

AMANN, R.P., GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A. O., VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. 1<sup>a</sup>. ed. Philadelphia: Lea & Febinger, n.80, p.715- 746. 1993.

AMMAN, R.P.; PICKETT, B.W.. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**. v.7, p.145-73, 1987.

BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, n.21, p.1 – 7. 2000.

BARTH AD, OKO RJ. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames: **Iowa State University Press**, 285p. 1985

BEORLEGUI N, CETICA P, TRINCHERO G, CÓRDOBA M, BECONI M. Comparative study of functional and biochemical parameters in frozen bovine sperm. **Andrologia**, v.29, p.37-42, 1997.

BIANCHI, I.; CALDERAM, K.; MASCHIO, E.F. et al. Inseminação artificial intra-uterina em leitoas com sêmen criopreservado com dimetilacetamida e glicerol. **Ciência Rural**, v.38, n.7, p.1978-1983, 2008.

BORTOLOZZO, F. P.; UEMOTO, D. A.; BENNEMANN, P. E.; POZZOBON, M. C.; CASTAGNA, C. D.; PEIXOTO, C. H.; BARIONI JR. W.; WENTZ, I. Influence of time of insemination relative to ovulation and frequency of insemination on gilt fertility. **Theriogenology**, v. 64, p. 1956-1962, 2005

BREZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; SLEBODZINSKI, A.B.; PIETRAS, B.; WIECZOREK, G. Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. **Biological Trace Element Research**, n.47, p.69–74. 1995.

BÚFALO, M.C.; CANDEIAS, J.M.; SOUSA, J.P.; BASTOS, J.K.; SFORCIN, J.M. *In vitro* cytotoxic activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis against HEP-2 cells. **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**, n.24, Issue 18, 2010.

BURH, M.M.; CURTIS, E.F.; KAKUDA, N.S. Compositions and behavior of head membrane lipid of fresh and cryopreserved boar sperm. **Cryobiology**, n. 31, p. 224 – 238. 1994.

CASTILHO, E. F.; GUIMARÃES, J. D.; MARTINS L. F. Uso de própolis e ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, n.38, p.2335-2345. 2009.

CASTRO, M. L. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**. v.30, n.7, p. 1512-1516. 2007.

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**, n.58, p.99–111. 2000.

CORCINI, C.D.; STEPHAN, M.H.L.; COLARES, E.P.; SANTOS, E.C.S.; VARELA, A.S. JR.; BONGALHARDO, D.C.; LUCIA, T. JR. *In vitro* assays for vesper mice (*calomys laucha*) sperm using coincubation and oocyte's cryopreservation. **Journal of experimental zoology**, p.96-102, 2012

CORREA, J.R.; PACE, M.M.; ZAVOS, P.M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics accessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology**, n.48. p.721-731, 1997.

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

ESPINOZA, J.A.; SCHULZ, M.A.; SÁNCHEZ, R.; VILLEGAS, J.A. Integrity of mitochondrial membrane potential reflects human sperm quality. **Andrologia**, n.41. p. 51–54. 2009.

EVENSON, D. P.; JOST, L. K.; MARSHALL, D.; ZINAMAN, M. J.; CLEGG, E.; PURVIS, K.; ANGELIS, P.; CLAUSSEN, O. P. Utility of the sperm chromatin structure as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Human Reproduction**, n. 14, n. 4, p. 1039-1049, 1999.

FISCHER, G.; PAULINO, N.; MARCUCCI, M. C. Green propolis phenolic compounds act as vaccine adjuvant, improving humoral and cellular responses in mice inoculated with inactivated vaccines. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** (Impresso), n. 105, v.7, p. 908-913. 2010.

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

GADEA, J.; MATA´S, C.; LUCAS, X. Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration (hIVP) assay. **Animal Reproduction Science**, n.56, p.95–108. 1998.

GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; JOERG, H.W. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, Champaign, n. 57, p. 1401-1406, 1997.

GRAVANCE CG, GARNER DL, BAUMBER J, BALL BA. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**, v.53, p.1691-1703, 2000.

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**, n. 84, p.2089–2100. 2006.

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 of Animal Science**, v.84, p.2089-2100, 2006.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**, v. 88, n. 1, p. 343-352, 1990.

HOFMO, P.O., GREVLE, I.S., Development and commercial use of frozen boar semen in Norway In (eds): Johnson, L.A., Guthrie, H.D. Boar semen preservation 2000. IV, 71 -77.

HOLT, W.V.; HEAD, M.F.; NORTH, R.D. Freeze-induced membrane damage in ram  
Induction of acrosome reactions of canine sperm by homologous zona pellucida.  
**Biology of Reproduction**. v. 48, p.841-845, 1992.

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

KAWAMOTO, A. M.D., OHASHI, K.M.D., KISHIKAWA, H.M.D., ZHU, L.M.D.,  
AZUMA, C. M.D., MURATA, Y.M.D. Two-color fluorescence staining of lectin and  
anti-CD46 antibody to assess acrosomal status. **Fertility and Sterility** v. 71, p.497-  
501, 1999.

KAWAKAMI, E.; VANDEVOORT, C.A.; MAHI-BROWN, C.A.; OVERSTREET, J.W.  
cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**. v.7, p.143-  
173, 1987

KIMOTO, T.; ARAI, S.; KOHGUCHI, M. Apoptosis and supression of tumor growth by  
artepillin C extracted from Brazilian propolis. **Cancer Detection and Prevention**,  
n.22, p.506-515, 1998.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV,  
R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of ptopolis of different  
geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, n.64, p.235-240. 1999.

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.

MACEDO JR., Milton Carvalho. **Teste de penetração espermática em oócitos *in vitro* e fertilidade *in vivo* após inseminação heterospérmica em suínos –**

Pelotas, 2007. – 98f. – Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2007.

MALO, C.; GIL, L.; GONZALEZ, N.; MARTINEZ, F.; CANO, R.; DE BLAS, I.; ESPINOSA, E. Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). **Cryobiology**, n.61, p.142–147. 2010

MORENO, M.I.N.; ISLA, M.I.; SAMPIETRO, A.R.; VATTUONE, M.A. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**, n.71, p.109-114. 2000.

MYHRE, O.; FONNUM, F. The effect of aliphatic, naphthenic, and aromatic hydrocarbons on production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in rat brain synaptosome fraction: the involvement of calcium, nitric oxide synthase, mitochondria, and phospholipase A. **Biochemical Pharmacology**, n.62, p.119–128 2001

NAGAI, T.; INOUE, R.; INOUE, H.; SUZUKI, N. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food Chemistry**, n.80, p.29-33. 2003

PARK, Y.K.; KOO, M.H.; ABREU, J.A.S. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganism. **Current Microbiology**, v.34, n.1, p.24-28, 1998.

PAVLOK, A. Penetration of hamster and pig zona-free eggs by boar ejaculated spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. **Biology of Reproduction**. v.46, p.1086-1094, 1981.

POPWELL, J.M.; FLOWERS, W.L. Variability in relationships between semen quality and estimates of in vivo and in vitro fertility in boars. **Animal Reproduction Science** n.81, p.97–113. 2004

ROTH, T.L. Heterologous *in vitro* fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). **Biology of Reproduction**, Champaign, v.58, p.475-482, 1998.

RUSSO A.; TRONCOSO N.; SANCHEZ F. Propolis protects human spermatozoa from DNA damage caused by benzo[a]pyrene and exogenous reactive oxygen species. **Life Sciences**, n.78, p.1401 – 1406. 2006.

SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**. v. 53, p. 1691-1703, 2006.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**. n.60, p.481-492. 2000.