



**CARLA OLIVEIRA RESENDE**

**ADIÇÃO DE FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À  
INSULINA TIPO I (IGF-I) E GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)  
AO SÊMEN SUÍNO CRIOPRESERVADO**

**LAVRAS-MG  
2017**

**CARLA OLIVEIRA RESENDE**

**ADIÇÃO DE FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA TIPO I (IGF-I) E  
GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) AO SÊMEN SUÍNO CRIOPRESERVADO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Produção e Reprodução Animal, para obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo  
Orientador

Dr. Rafael Pedroso Betarelli  
Dr. Joan Enric Rodriguez-Gil  
Coorientadores

**LAVRAS-MG  
2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA,  
com dados informados pelo (a) próprio (a) autor (a).

Resende, Carla Oliveira.

Adição de fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) e Glutathione Reduzida (GSH) ao sêmen suíno criopreservado/Carla Oliveira Resende. – Lavras: UFLA, 2017.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2017. Orientador: Márcio Gilberto Zangeronimo.  
Bibliografia.

1. Antioxidante. 2. Congelamento de sêmen. 3. Qualidade seminal. 4. Reprodução. 5. Suinocultura. I. Universidade Federal de Lavras. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**CARLA OLIVEIRA RESENDE**

**ADIÇÃO DE FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA TIPO I  
(IGF-I) E GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) AO SÊMEN SUÍNO  
CRIOPRESERVADO**

***ADDITION OF INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR – I (IGF-I) AND REDUCED  
GLUTATHIONE (GSH) TO CRYOPRESERVED BOAR SEMEN***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Produção e Reprodução Animal, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 21 de julho de 2017.

Prof. Dr. Raimundo Vicente de Sousa	UFLA
Prof. Dr. Juliano Vogas Peixoto	UFLA
Prof. Dr. Joan Enric Rodríguez-Gil	Universidade Autônoma de Barcelona - Espanha

Prof. Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo  
Orientador

**LAVRAS-MG  
2017**

*DEDICO,*

*Aos meus pais, Kleber e Maryjane.*

*Aos meus irmãos, Caroline e Alexander.*

*Ao meu afilhado, Henrique.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela força que me concede diante de cada obstáculo e por me mostrar que, apesar das dificuldades, ao final tudo sempre dará certo, basta acreditar e lutar pelos nossos sonhos.

Aos meus pais, Kleber e Maryjane, pela dedicação, esforço, amor, incentivo e oportunidade que me concederam para a realização desse sonho.

Aos meus irmãos, Caroline e Alexander, pelo grande apoio, inspiração e incentivo. Ao meu afilhado, Henrique, pelos momentos mágicos da vida.

À Universidade Federal de Lavras, aos professores do Departamento de Medicina Veterinária e ao programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, pelos ensinamentos que me foram concedidos durante minha caminhada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo, pelos ensinamentos, incentivo, apoio e por me conceder essa oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

Aos meus coorientadores, Dr. Rafael Pedroso Betarelli, pelo grande apoio e companheirismo durante a realização desse projeto, tornando os momentos difíceis mais leves e descontraídos, e ao Prof. Joan Enric Rodrigues-Gil, da Universidade Autônoma de Barcelona, Espanha, pelo apoio, desenvolvimento e treinamento para que o projeto fosse executado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, processo nº 88881.030399/2013-01) pelo suporte financeiro concedido para a realização desse projeto.

À Fazenda São Paulo e a Empresa Minitube do Brasil pela parceria e auxílio na realização do experimento.

Ao grupo GETESE, pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal, pela ajuda de todos os integrantes e pelos momentos de descontração e aprendizado.

Às meninas da pós-graduação, Bárbara, Stênia, Thais e Bruna, pelos momentos de alegria, incentivo e amizade.

Ao Fidelis, pelo apoio em diversas análises do experimento, momentos de descontração e diversão.

Às amigas que a vida me proporcionou, Carol, Pathula, Melissa, Ingris e Ruana, pelos momentos divertidos e fantásticos que compartilhamos.

Agradeço imensamente a todos que me apoiaram e contribuíram de alguma forma para a realização desse sonho.

## RESUMO

Objetivou-se avaliar a influência da adição de GSH ao meio de congelamento do sêmen suíno, adicionado ou não de IGF-I ou anti-IGF-I, sobre a qualidade do sêmen suíno congelado. Oito ejaculados provenientes de oito varrões das raças Duroc e Large White foram utilizados. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso (ejaculado) com seis tratamentos e oito repetições. Os tratamentos foram: T1: controle (sêmen diluído); T2: controle + IGF-I; T3: controle + anticorpo anti-IGF-I; T4: controle + GSH; T5: Controle + GSH + IGF-I e T6: Controle + GSH + anticorpo anti-IGF-I. O IGF-I (30 ng/mL de sêmen) ou seu anticorpo (60 ng/mL) foram adicionados logo após a diluição do sêmen fresco e o GSH (5 mM) ao meio de congelamento. Amostras de sêmen foram avaliadas antes e após 24 horas de resfriamento, e também logo após o descongelamento. Para isso, as amostras foram incubadas a 37°C em banho-maria e avaliadas após 10 e 120 minutos de incubação. A adição de IGF-I e de seu anticorpo aumentou ( $P<0,05$ ) a resistência osmótica e a integridade de acrossoma do sêmen suíno fresco incubado por 120 minutos. Após 24 horas de resfriamento, essas substâncias aumentaram ( $P<0,05$ ) a porcentagem de células com maior atividade mitocondrial e reduziram a porcentagem de células com elevados níveis de superóxidos após 120 minutos de incubação. No entanto, o anti-IGF-I reduziu ( $P<0,05$ ) a porcentagem de espermatozoides viáveis e tanto o IGF-I quanto o anti-IGF-I diminuíram ( $P<0,05$ ) a intensidade de células com alto potencial mitocondrial de membrana em relação ao controle aos 10 minutos de incubação. Após o descongelamento e aos 10 minutos de incubação, o GSH, associado ou não diminuiu ( $P<0,01$ ) a integridade do acrossoma em relação ao controle. Quando associado, o GSH diminuiu ( $P<0,05$ ) a resistência osmótica e a porcentagem de espermatozoides com elevada atividade mitocondrial. Menores valores de peróxidos e superóxidos intracelulares foram observados ( $P<0,01$ ) quando o GSH foi associado ao IGF-I ou anti-IGF-I. Aos 120 minutos de incubação, o GSH associado ou não reduziu ( $P<0,01$ ) a porcentagem de espermatozoides com acrossoma intacto, a intensidade de células com elevado teor de superóxidos e a porcentagem de espermatozoides com elevado teor de peróxidos. Conclui-se que os efeitos da adição de GSH aos meios de congelamento do sêmen suíno parecem estar relacionados à presença desse hormônio no ejaculado. Maior potencial antioxidante do GSH ao sêmen suíno descongelado pode ser observado quando ocorre um bloqueio do sistema IGF-I do sêmen. A adição de IGF-I ou de seu anticorpo melhora a qualidade do sêmen fresco diluído e aumenta o potencial antioxidante tanto do sêmen resfriado quanto do sêmen descongelado.

**Palavras-chave:** Antioxidante. Congelamento de sêmen. Qualidade seminal. Reprodução. Suinocultura.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the influence of the addition of GSH to the freezing medium of swine semen, added or not of IGF-I or anti-IGF-I, on the quality of frozen swine semen. Eight ejaculates from eight Boars of the Duroc and Large White breeds were used. The experimental design was a randomized block design (ejaculate) with six treatments and eight replications. The treatments were: T1: control (diluted semen); T2: control + IGF-I; T3: control + anti-IGF-I antibody; T4: control + GSH; T5: Control + GSH + IGF-I and T6: Control + GSH + anti-IGF-I antibody. IGF-I (30 ng / ml semen) or its antibody (60 ng / ml) were added shortly after the dilution of fresh semen and GSH (5 mM) to the freezing medium. Samples of semen were evaluated before and after 24 hours of cooling, and also soon after thawing. For this, the samples were incubated at 37°C in a water bath and evaluated after 10 and 120 minutes of incubation. Addition of IGF-I and its antibody increased ( $P < 0.05$ ) the osmotic resistance and acrossomal integrity of fresh swine semen incubated for 120 minutes. After 24 hours of cooling, these substances increased ( $P < 0.05$ ) the percentage of cells with higher mitochondrial activity and reduced the percentage of cells with high superoxide levels after 120 minutes of incubation. However, anti-IGF-I reduced ( $P < 0.05$ ) the percentage of viable spermatozoa and both IGF-I and anti-IGF-I decreased ( $P < 0.05$ ) the intensity of cells with high mitochondrial membrane potential relative to the control at 10 minutes incubation. After thawing and at 10 minutes incubation, GSH associated or not with IGF-I or anti-IGF-I decreased ( $P < 0.01$ ) the acrosome integrity in relation to the control. When associated, GSH decreased ( $P < 0.05$ ) the osmotic resistance and the percentage of spermatozoa with high mitochondrial activity. Lower values of peroxides and intracellular superoxides were observed ( $P < 0.01$ ) when GSH was associated with IGF-I or anti-IGF-I. At 120 minutes incubation, GSH associated or not reduced ( $P < 0.01$ ) the percentage of spermatozoa with intact acrosome, the intensity of cells with a high superoxide content and the percentage of spermatozoa with high peroxide content. It is concluded that the effects of the addition of GSH to the freezing media of the porcine semen seem to be related to the presence of this hormone in the ejaculate. Greater antioxidant potential of GSH to thawed swine semen can be observed when a blockade of the IGF-I semen system occurs. The addition of IGF-I or its antibody improves the quality of diluted fresh semen and increases the antioxidant potential of both cooled semen and thawed semen.

Keywords: Antioxidant. Freezing of semen. Seminal quality. Reproduction. Pig breeding.

## LISTA DE FIGURAS

### PRIMEIRA PARTE

- Figura 1: Estrutura do receptor de IGF-I (IGF-IR), receptor transmembrânico tetramérico do tipo tirosina quinase..... 21
- Figura 2: Representação simplificada de algumas vias de sinalização dos componentes intracelulares da interação do IGF-I com seu receptor IGF-IR ..... 22
- Figura 3: Mecanismo de ação da glutathiona para inativação do peróxido de hidrogênio..... 24

## LISTA DE TABELAS

### SEGUNDA PARTE – ARTIGO

- Tabela 1 - Características do sêmen suíno diluído 120 minutos após a adição de fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) e de anticorpo anti-IGF- I..... 59
- Tabela 2 - Características do sêmen suíno refrigerado por 24 horas a 17°C com adição de fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) e de anticorpo anti-IGF-I, mantido a 37 °C durante 10 e 120 minutos após refrigeração..... 60
- Tabela 3 - Características do sêmen suíno descongelado após a adição de fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) e de anticorpo anti-IGF-I no sêmen fresco (antes do resfriamento) e da glutathione reduzida (GSH) após o resfriamento (antes do congelamento), mantido a 37 °C durante 10 minutos após descongelamento. .... 61
- Tabela 4 - Características do sêmen suíno descongelado após a adição de fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) e de anticorpo anti-IGF-I no sêmen fresco (antes do resfriamento) e da glutathione reduzida (GSH) após o resfriamento (antes do congelamento), mantido a 37 °C durante 120 minutos após descongelamento. .... 62

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE.....</b>	<b>12</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Importância da criopreservação do sêmen na espécie suína.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2 Características do espermatozoide suíno e principais danos celulares relacionados à criopreservação.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3 Principais respostas celulares frente aos desafios da criopreservação.....</b>	<b>16</b>
<b>2.4 Espécies reativas de oxigênio (ERO) e a criopreservação de espermatozoides.....</b>	<b>18</b>
<b>2.5 Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) na reprodução dos machos.....</b>	<b>19</b>
<b>2.6 A Glutathiona Reduzida (GSH).....</b>	<b>23</b>
<b>3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>25</b>
<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGO.....</b>	<b>35</b>

## **PRIMEIRA PARTE**

### **1 INTRODUÇÃO**

A suinocultura é uma atividade importante, considerando o cenário crescente de demanda mundial por proteína de origem animal. Atualmente, a carne suína é a mais consumida no mundo, cerca de 43% do consumo mundial de carnes (USDA, 2016). No Brasil, embora não seja a principal atividade pecuária, a suinocultura contribui para os índices de crescimento do país, gerando um Produto Interno Bruto de R\$ 62,57 bilhões, além de 126 mil empregos diretos e mais de 900 mil indiretos em 2015 (ABCS, 2016). Nesse caso, a obtenção de melhores índices zootécnicos com o uso de animais de elevada eficiência reprodutiva se faz necessário.

A criopreservação de sêmen na espécie suína ainda enfrenta muitas limitações quando comparada à espécie bovina, principalmente devido às características peculiares do espermatozoide, que dificulta a implementação de uma metodologia adequada para o congelamento. Vários estudos estão sendo realizados, contudo, sua taxa de sucesso ainda não alcançou os parâmetros necessários para seu uso a nível comercial. Atualmente, o uso do sêmen suíno congelado representa menos de 1% do total de inseminações artificiais nessa espécie (RODRÍGUEZ-GIL; ESTRADA, 2013).

Com objetivo de melhorar a qualidade do sêmen suíno criopreservado, diversos estudos têm associado o uso de substâncias crioprotetoras capazes de minimizar os efeitos deletérios do processo de congelamento e descongelamento. Dentre essas substâncias, destaca-se a glutathiona reduzida (GSH), um antioxidante vital para a manutenção do balanço redox intracelular e para manter a estabilidade da estrutura nucleoprotéica das células após o descongelamento (YESTE et al., 2013a). Entretanto, resultados contraditórios podem ser encontrados na literatura (BAUMBER et al., 2003; CÂMARA et al., 2011; GADEA et al., 2004; SILVA et al., 2011a), demonstrando que o efeito da GSH parece ser dose-dependente.

Outra substância importante que pode estar relacionada aos eventos crioprotetores dos espermatozoides é o fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I). Sabe-se que o IGF-I é capaz de regular a fosforilação de proteínas intracelulares (HIGASHI et al., 2012; ROCHA et al., 2013) e acelerar o metabolismo energético (MACPHERSON et al., 2002). No entanto, alguns trabalhos relatam resultados contraditórios de acordo com a dosagem adicionada desse hormônio ao sêmen, tempo de armazenamento e sua interação com outras substâncias (HIRAI et al., 2001; MENDEZ et al., 2012; SILVA et al., 2011a).

Os efeitos da adição do GSH associado ao IGF-I no sêmen suíno criopreservado não tem sido verificada na literatura, nem mesmo as consequências dessa interação. Dessa forma, objetivou-se com esse estudo avaliar os efeitos da adição de GSH ao meio de congelamento do sêmen suíno, na presença ou ausência de IGF-I, sobre a qualidade do sêmen suíno congelado.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### ***2.1 Importância da criopreservação do sêmen na espécie suína***

A criopreservação é uma técnica que visa manter a integridade das células ou tecidos biológicos a temperaturas muito baixas, geralmente a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com posterior retomada das funções celulares normais após o descongelamento (PEGG, 2007). A ideia de criopreservação surgiu no final do século XVIII, no entanto, só começou a ser aplicada após o descobrimento de propriedades crioprotetores do glicerol por Polge e colaboradores em 1949, propiciando um avanço na determinação dos protocolos de criopreservação. Na década de 1950, com a utilização do nitrogênio líquido, estimulou-se a criação de bancos de esperma e de inúmeras pesquisas nessa área (WALTERS, 2009).

Os estudos com suínos tiveram significativo avanço apenas na década de 1970, quando alguns protocolos de congelamento específicos para espécie suína foram descritos (PAQUIGNON et al., 1974; WESTENDORF et al., 1975). A partir de então, pesquisas buscam aperfeiçoar essas técnicas na tentativa de melhorar a qualidade e a aplicabilidade do sêmen suíno congelado. Entretanto, os resultados ainda não são satisfatórios para uso na inseminação artificial.

De acordo com Roca et al. (2011), o uso do sêmen congelado normalmente reduz a taxa de parição na ordem de 10 a 20% e cerca de dois a três leitões a menos por leitegada, quando comparado ao sêmen resfriado. Além disso, há uma grande variabilidade individual dos ejaculados na capacidade de resistir aos danos da criopreservação (YESTE et al., 2013b), elevando a necessidade de se aumentar o número de espermatozoides por dose inseminante (HOLT, 2000). Tais características, associadas aos diferentes protocolos até então existentes, elevam os custos das doses inseminantes, restringindo seu uso apenas em programas de melhoramento genético (BORTOLOZZO et al., 2005).

Um dos principais problemas para a criopreservação do sêmen são as mudanças físico-químicas no meio intra e extracelulares, que culminam na formação de cristais de gelo durante a passagem dos espermatozoides pela faixa de temperatura compreendida entre

- 15 e - 60 °C (YESTE, 2016). Além disso, o estresse oxidativo gerado durante o processo de congelamento e descongelamento está relacionado ao aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (CHATTERJEE; DE LAMIRANDE; GRAGNON, 2001), o que acarreta em danos às membranas celulares (FORD, 2004), redução da motilidade e da viabilidade espermática (BUCAK et al., 2007), alteração da estrutura nuclear do espermatozoide (BAUMBER et al., 2003; FLORES et al., 2011) e, conseqüentemente, da fusão com o oócito (BUCAK et al., 2007).

No intuito de melhorar a qualidade espermática após o descongelamento, a adição de diferentes substâncias ao sêmen suíno tem sido avaliada, buscando minimizar os danos causados pelo processo de criopreservação. Nesse sentido, a adição de protetores de membranas que dificultam a formação de cristais de gelo ou a geração de radicais livres tem sido considerada bastante viável (BETARELLI et al., 2016; MALO et al., 2010; PEREIRA et al., 2014; YESTE et al., 2014). Além disso, o conhecimento acerca dos mecanismos de modulação de uma resposta celular frente aos danos causados pelo congelamento é de extrema importância para o avanço na técnica de congelamento de sêmen suíno (HIGASHI et al., 2012; SILVA et al., 2011b), permitindo seu uso na inseminação artificial.

## ***2.2 Características do espermatozoide suíno e principais danos celulares relacionados à criopreservação***

O espermatozoide suíno possui características específicas em sua composição que o torna mais susceptível ao choque por oscilação de temperatura (ANTUNES, 2007; YESTE et al., 2015). Além disso, as características do ejaculado podem variar de acordo com a raça, idade, estado nutricional do animal, estação do ano e intervalo entre coletas (SONDERMAN; LUEBBE, 2008). Essas representam um desafio à criopreservação do sêmen nessa espécie.

A principal característica do espermatozoide suíno está na constituição da membrana espermática (JOHNSON et al., 2000; SQUIRES et al., 1999; WATSON, 1995), a qual apresenta menor quantidade de colesterol e em maior distribuição assimétrica (maior na monocamada interna do que na externa) quando comparado às demais espécies (CASAS; FLORES, 2013). Tal característica resulta em maior fluidez e, conseqüentemente, maior susceptibilidade a injúrias. Também apresenta menor quantidade de fosfatidilcolina e maior de fosfatidiletanolamina e esfingomiélinina (JOHNSON et al., 2000), além de diferenças na composição dos ácidos graxos insaturados, que possuem poucas duplas ligações do tipo

*cis* (CEROLINI et al., 2000). Essas particularidades geram diferentes capacidades de resposta às injúrias celulares quando comparado às demais espécies.

De uma maneira geral, a membrana plasmática do espermatozoide exerce um papel importante no processo de fecundação, uma vez que esta diretamente relacionada ao processo de capacitação, reação acrossômica e fusão com oócito (CUASNICU et al., 2001). Como a composição da membrana é diferente de acordo com as partes do espermatozoide (cabeça, peça intermediária e cauda) (FLESCHE; GADELLA, 2000), acredita-se que a resposta ao estresse gerado pelo processo de criopreservação também seja diferente. Segundo Christensen; Parlevliet; Buiten (1994), os espermatozoides podem, por exemplo, apresentar boa motilidade pós-descongelamento, porém, com danos de acrossoma que reduzem sua capacidade fecundante ou apresentar baixa motilidade e serem viáveis.

Devido a essas características, diferentes tipos de injúrias podem acometer o mesmo espermatozoide, gerando aumento da permeabilidade da membrana e consequente perda de cátions e enzimas através da mesma, redução da atividade enzimática e dos processos de difusão controlados pela membrana e mudanças no movimento lateral de canais, resultando em diferentes modificações na função espermática (JOHNSON et al., 2000; LEAHY; GADELLA, 2011). Além disso, a passagem do estado fluido para um estado de gel dos lipídeos provoca alterações cinéticas de algumas enzimas, incluindo ATPases de membrana (HOLT, 2000).

Além da influência direta das baixas temperaturas às membranas espermáticas, a peroxidação lipídica provocada pela presença de espécies reativas de oxigênio (ERO) formadas durante a criopreservação também representa um problema para a manutenção da qualidade espermática pós-descongelamento (SIKKA, 2004). Os espermatozoides suínos são muito sensíveis aos danos oxidativos por apresentarem grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados (CASAS; FLORES, 2013) associados à baixa capacidade antioxidante do plasma seminal (BREZEZINSKA-SLEBODZINSKA et al., 1995).

O excesso de ERO inibe a atividade das mitocôndrias, altera a conformação das membranas e de determinadas proteínas intracelulares, prejudicando as atividades das células (CUI et al., 2012; SHARMA, AGARWAL, 1996; TAVILANI et al., 2008). A capacidade de resistir aos danos provocados pela ERO varia entre as raças e até mesmo entre ejaculados de um mesmo animal (CORCINI et al., 2012).

Além dos danos relacionados à membrana e nas mitocôndrias, o processo de criopreservação também ocasiona danos no núcleo dos espermatozoides (HOLT, 2000). Com relação aos danos nucleares, esses resultam principalmente em fragmentação do DNA

ou desestabilização da estrutura nucleoprotéica (SILVA; GADELLA, 2006) através do rompimento das pontes dissulfeto que mantém a estabilidade da cromatina (FLORES et al., 2011). Esses mecanismos ainda são desconhecidos, podendo ou não estar relacionados à presença de ERO (YESTE et al., 2013a).

A capacidade dos espermatozoides em resistirem aos danos provocados pela criopreservação ainda precisam ser melhor compreendidas. Portanto, estudos são necessários para aperfeiçoar os protocolos já existentes, por meio da adição de substâncias ao diluidor ou ao meio de congelamento, capazes de melhorar a qualidade do espermatozoide suíno criopreservado.

### ***2.3 Principais respostas celulares frente aos desafios da criopreservação***

Os espermatozoides são células transcricionalmente quiescentes, sendo incapazes de desenvolver uma resposta fisiológica frente ao estresse ambiental através da modulação gênica. No entanto, conseguem modular sua resposta fisiológica através de modificações pós- traducionais de proteínas, tais como a fosforilação/desfosforilação, por exemplo (FERNÁNDEZ-NOVELL et al., 2011).

De uma maneira geral, a função espermática depende do consumo de substratos energéticos presentes no plasma seminal, sendo a via glicolítica e a fosforilação oxidativa importantes vias metabólicas de utilização desses substratos (NELSON; COX, 2004). A fosforilação oxidativa e o ciclo de Krebs ocorrem na peça intermédia do espermatozoide (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006) e resulta na formação de adenosina trifosfato (ATP) (NELSON; COX, 2004).

O espermatozoide utiliza substratos energéticos para manter sua taxa de sobrevivência e capacidade de fertilização. A glicose é um monossacarídeo de preferência para a célula espermática, pois é rapidamente consumido por meio da glicólise e produz grande quantidade de energia, quando comparado a outros açúcares, como a frutose, sorbitol e manose, uma vez que a hexoquinase do espermatozoide suíno é mais eficaz em fosforilar a glicose do que outros substratos (MEDRANO et al., 2004). Essas vias metabólicas produzem ATP, necessário para manter a capacitação, hiperatividade e motilidade espermática (RAMIÓ- LLUCH et al., 2013), as quais são reguladas pelas vias de sinalização da adenosina monofosfato cíclica (AMPc), que é dependente de ATP (GADELLA; VAN GESTEL, 2004). O AMPc é um segundo mensageiro celular responsável pela ativação de proteínas quinase que fosforilam uma série de outras proteínas que atuam sobre diferentes vias metabólicas (GADELLA; VAN GESTEL, 2004).

Dentre essas proteínas, destacam-se as relacionadas à modulação do estresse, as *heat-shock protein* (HSPs), proteínas relacionadas a apoptose celular, como as caspases (ERATA et al., 2008) e as proteínas relacionadas ao controle do ciclo celular, como a AKT/proteína quinase B (AQUILA et al., 2004) e glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3) (APARICIO et al., 2007). Essas proteínas estão relacionadas à resposta de defesa da célula espermática contra condições adversas, por exemplo, oscilação de temperatura causada durante o processo de congelamento e descongelamento, estresse osmótico e oxidativo.

Em condições adversas, os níveis de HSPs são aumentados, auxiliando na síntese e maturação de novas proteínas em substituição àquelas afetadas pelo estresse metabólico. Além disso, as HSPs facilitam manter a estrutura das proteínas danificadas, auxiliando na sua eliminação, quando não são passíveis de restauração (MEYER; BUKAU, 2005). Também ocorre ativação e fosforilação da via PI 3-quinase e, conseqüentemente, das proteínas envolvidas no metabolismo celular, como a Akt e a GSK-3. A Akt está relacionada com várias funções vitais como o crescimento, regulação da síntese proteica e transcrição (AQUILA et al., 2004). Já a GSK-3 está relacionado com o controle da capacitação espermática e resistência ao estresse oxidativo (APARICIO et al., 2007).

Portanto, a utilização de substâncias que acelerem essas rotas metabólicas, quando os substratos presentes no plasma seminal são reduzidos, devido ao processo de criopreservação, pode acelerar o consumo de substratos energéticos pela célula espermática. Dentre essas substâncias, estudos indicam que a adição do IGF-I pode acelerar o metabolismo energético do espermatozoide (HENRICKS et al., 1998; MENDEZ et al., 2012; SELVARAJU et al., 2009; SILVA et al., 2011a). No entanto, essas vias metabólicas podem gerar radicais livres altamente reativos, que danificam as células espermáticas (NELSON; COX, 2004), sendo interessante a associação de antioxidantes, como o GSH, no processo de criopreservação, já que essa técnica gera um aumento da produção de ERO (GIARETTA et al., 2015).

Segundo Thompson; Franklin (2010) foi comprovado que a inibição do transporte de GSH para a mitocôndria leva ao dano oxidativo, uma vez que a mitocôndria libera substâncias pró apoptóticas no citoplasma, como o citocromo *c*. Quando ocorre diminuição dos níveis de GSH mitocondrial, a produção de energia/ATP diminui. O déficit energético mitocondrial leva à liberação de citocromo *c* pela organela, alterando a permeabilidade de membrana mitocondrial e ativando as caspases 3 e 9, proteínas que lideram os eventos que culminam na apoptose celular (ANAZETTI; MELO, 2007).

As mudanças ocasionadas pela criopreservação representam uma condição adversa

aos espermatozoides e esses sinais são interpretados e desencadeiam modificações pós-translacionais de proteínas coordenados por eventos que envolvem uma série de alterações na célula espermática, como a fosforilação de proteínas relacionadas à proteção ou a apoptose celular (MEDRANO et al., 2006). Dessa maneira, o uso de substâncias que influenciam essas rotas metabólicas e modulam uma resposta celular frente à crioinjúrias pode ser importante para melhorar a qualidade do sêmen descongelado.

#### **2.4 Espécies reativas de oxigênio (ERO) e a criopreservação de espermatozoides**

A formação de ERO ocorre durante o metabolismo oxidativo celular, com consequente formação de intermediários químicos reativos, como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxila (OH $\cdot$ ), óxido nítrico ( $NO^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (BATHGATE, 2011). Os principais danos causados pela ERO ocorrem quando essas doam ou retiram um elétron de maneira não emparelhada de moléculas pertencentes à estrutura celular, tais como ácidos graxos insaturados, DNA e aminoácidos (NORDBERG; ARNER, 2001), reduzindo a capacidade fecundante do espermatozoide (BUCAK et al., 2010).

No entanto, pequenas quantidades de ERO no sêmen são necessárias para a função espermática normal, pois induzem a capacitação, hiperativação e a fusão do espermatozoide no oócito (BALDI et al., 2002; GANGWAR; ATREJA, 2015). As ERO estão envolvidas nos primeiros eventos da capacitação espermática, por estimular a cascata de sinalização de fosforilação da tirosina e desativar enzimas fosfatases, através da ativação da adenilato ciclase solúvel, aumentando assim o AMPc intracelular e, consequentemente, ativando proteínas quinases envolvidas na capacitação (GANGWAR; ATREJA, 2015).

Por outro lado, em altas concentrações promove um ataque oxidativo sobre os lipídeos da membrana espermática, iniciando a cascata de peroxidação lipídica. Esse é intensificado devido à membrana plasmática do espermatozoide suíno conter grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados e o citoplasma, baixa concentração de enzimas protetoras (SHARMA; AGARWAL, 1996) tornando-os mais sensíveis ao estresse oxidativo. Os ácidos graxos poli-insaturados são susceptíveis à ação dos radicais livres por apresentarem ligações duplas entre o carbono, local de reação de peroxidação lipídica (TVRDA et al., 2011).

O plasma seminal e mesmo o próprio espermatozoide possuem uma série de substâncias antioxidantes a fim de prevenir o estresse oxidativo. Dentre essas substâncias, destacam-se a glutationala peroxidase (GSx), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), tocoferol, ácido ascórbico, urato, albumina, taurina e hipotaurina (SMITH et al., 1996). A

GSx protege as membranas plasmáticas do estresse oxidativo e está envolvida na regulação do balanço REDOX. A SOD é responsável pela produção de  $H_2O_2$  e  $O_2$  durante a dismutação dos radicais superóxidos. O  $H_2O_2$  facilmente consegue passar pelas membranas celulares e exercer efeitos citotóxicos, mas é convertido em  $H_2O$  pela CAT (KANKOFER et al., 2005).

Durante o processo de criopreservação há produção excessiva de ERO e também redução da capacidade antioxidante dos espermatozoides, devido à retirada do plasma seminal no processo de congelamento (BILODEAU et al., 2000; GADEA et al., 2004). Além do choque térmico, a exposição ao oxigênio atmosférico e o manuseio do sêmen, durante o processo de congelamento, favorecem a produção de ERO (BUCAK et al., 2008), que pode destruir a estrutura da matriz lipídica, levando a perda da integridade de membrana, queda da motilidade espermática e ao processo de apoptose (AGARWAL; MAKKER; SHARMA, 2008).

As elevadas concentrações de ERO produzidas pelo processo de criopreservação ocasionam ruptura da membrana mitocondrial, ocorrendo eliminação da proteína citocromo-c da mitocôndria que ativa as caspases e induz a apoptose (MANEESH; JAYALEKSHIMI, 2006). Também o nível elevado de ERO no sêmen altera a interação estrutural nucleoproteína-DNA através da ruptura de pontes dissulfeto entre cisteína em nucleoproteínas espermáticas, resultando em fragmentação do DNA devido à desestabilidade gerada na cromatina (ESTRADA et al., 2014; FLORES et al., 2011; SCHULTE et al., 2010; YESTE et al., 2013a). Além disso, a criopreservação gera um aumento intracelular da concentração de cálcio no espermatozoide, que pode levar a capacitação prematura dos espermatozoides, com conseqüente redução na longevidade espermática (BALL, 2008).

Uma alternativa para reduzir a ação das ERO sobre a célula espermática é melhorar a capacidade antioxidante seminal. Dessa forma, a utilização de antioxidantes pode ser uma alternativa para manter a qualidade espermática após o descongelamento e diminuir os danos gerados pela produção excessiva de ERO.

## ***2.5 Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) na reprodução dos machos***

O IGF-I é um polipeptídeo formado por 70 aminoácidos, cuja sequência é semelhante com à pró-insulina e exerce efeitos parecidos aos da insulina (ROSENDAL et al., 2002). É produzido, principalmente, no fígado em resposta ao hormônio do crescimento (GH) com papel importante no crescimento, diferenciação, reparação, sobrevivência e no

metabolismo de múltiplas células e tecidos (HIGASHI et al., 2012).

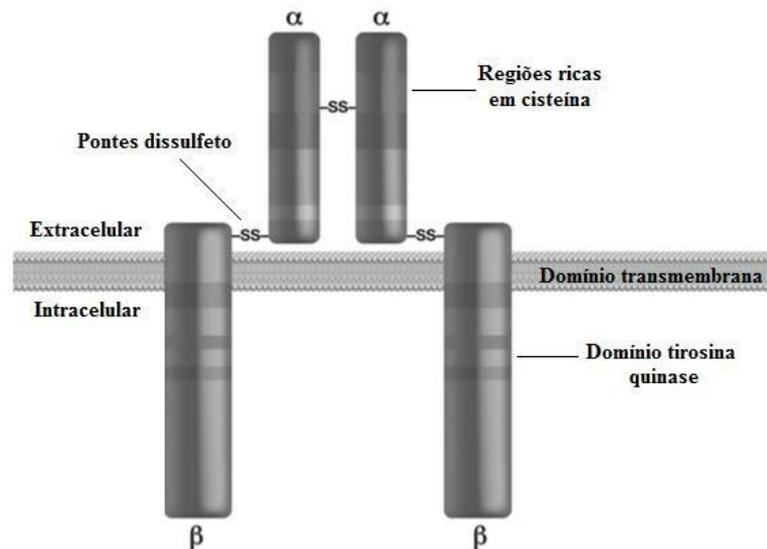
No trato reprodutivo masculino, o IGF-I tem sido identificado nos testículos, podendo desempenhar importante papel no controle parácrino e autócrino da função testicular (LIN, 1995; ROSER, 2001), envolvido no processo de espermatogênese, na maturação e ativação da motilidade espermática e na fertilidade do sêmen (MACPHERSON et al., 2002; VICKERS et al., 1999).

Receptores de IGF-I foram identificados em espermatogônias, espermátócitos, espermátides e espermatozoides (HENRICKS et al., 1998). A interação entre IGF-I e seu receptor está envolvido com o desenvolvimento do espermatozoide, maturação espermática e na ativação da motilidade e vigor espermático (VICKERS et al., 1999). No entanto, na literatura pesquisada não foi encontrado a quantidade de receptores para IGF-I na membrana de célula espermática suína. Já em bovinos, segundo Henricks et al. (1998) existem em média 1000 receptores para IGF-I em cada célula espermática.

Em suínos a concentração média de IGF-I endógeno encontrada por Silva et al. (2011a) foi de 1,5 ng/mL no plasma seminal, diferente de outros estudos que demonstraram variação entre 8,4 a 22,2 ng/mL (KUMARESAN, 2009; LEWIS, 2005). Em comparação, a média encontrada no sêmen de equinos foi de 10,3 ng/mL (MACPHERSON et al., 2002) e em bovinos 130,0 ng/mL de IGF-I, variando entre raça e idade dos animais (HENRICKS et al., 1998).

O IGF-I exerce suas funções mediante acoplamento com seu receptor IGF-IR, um receptor transmembrânico tetramérico do tipo tirosina quinase que apresenta estrutura similar ao receptor da insulina (RUSSO et al., 2005). Possui duas subunidades  $\alpha$  e duas subunidades  $\beta$ , unidos por ligações dissulfeto (SILVA; FIGUEIREDO; VAN DEN HURK, 2009), acoplando duas  $\alpha$ - $\beta$  hemi-receptores para formar o receptor completo (MARTINELLI; CUSTÓDIO; AGUIAR-OLIVEIRA, 2008). A subunidade  $\alpha$ , extracelular, contém os sítios de ligação que são ricos em cisteína e unem-se aos ligantes. Já a subunidade  $\beta$  possui uma parte extracelular, um segmento transmembrânico e uma parte intracelular, além de uma região com atividade tirosina-quinase intrínseca (VINCENT; FELDMAN, 2002) (Figura 1).

Figura 1: Estrutura do receptor de IGF-I (IGF-IR), receptor transmembrânico tetramérico do tipo tirosina quinase.

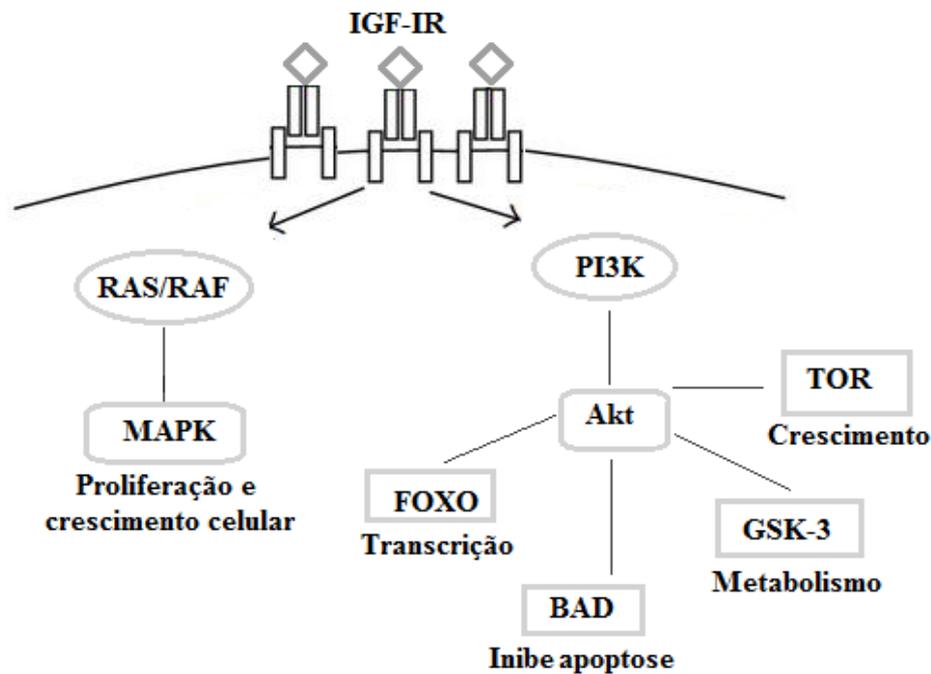


Fonte: Modificado de Vincent e Feldman (2002).

A ligação de IGF-I ao seu receptor IGF-IR promove uma atividade intracelular tirosina quinase intrínseca que fosforila os substratos do próprio receptor e de proteínas associadas (HIGASHI et al., 2012). Em seguida, leva a ativação de várias vias de sinalização. Dentre elas, existem duas principais cascatas de sinalização, a fosforilação Ras/Raf e ativação da MAPK (proteína quinase ativada por mitógenos), as quais participam de uma diversidade de processos biológicos essenciais, incluindo controle do ciclo celular, proliferação de células, apoptose, ativação do sistema imune e proteção contra o estresse oxidativo (SEGER; KREBS, 1995).

A segunda principal cascata de sinalização é do fosfatidil-inositol 3-quinase (PI3K) que ativa Akt, a qual inibe sinais pró-apoptótico e induz a transcrição, crescimento e metabolismo celular (CHAVES; WASIF SAIF, 2011; RUSSO et al., 2005) (Figura 2). A Akt é responsável pela fosforilação de uma proteína citosólica chamada de BAD, a qual, em seu estado não fosforilado, provoca a morte celular por apoptose. Também está relacionada com funções de crescimento e metabolismo das células, por meio de mecanismos mais complexos, dependente de uma serinatreonina-cinase chamada de TOR e o GSK-3. Outra importante função da Akt é a regulação da transcrição gênica através da inativação de FOXO (fatores de transcrição da forquilha) (BIRKENKAMP; COFFER, 2003).

Figura 2: Representação simplificada de algumas vias de sinalização dos componentes intracelulares da interação do IGF-I com seu receptor IGF-IR.



Fonte: do autor.

Henricks et al. (1998) sugerem que o IGF-I atua como regulador do metabolismo energético celular. A ação de IGF-I estimulou a motilidade e a ativação espermática, sugerindo que esse hormônio pode estar relacionado com a capacidade fecundante dos espermatozoides devido à continuidade da motilidade após ejaculação (MACPHERSON et al., 2002). Segundo Silva et al. (2011a) a adição de IGF-I após o armazenamento do sêmen suíno por 24 horas, teve resultados benéficos, aumentando a relação entre vivos e mortos e a resistência osmótica. No entanto, aumentou a taxa de peroxidação lipídica, sugerindo maior formação de radicais livres devido ao aumento do consumo de substratos energéticos pelos espermatozoides. Assim, a associação desse hormônio com antioxidantes poderia melhorar a qualidade do sêmen suíno descongelado.

Apesar de vários trabalhos utilizarem o IGF-I no sêmen suíno (GANCARCZYK et al., 2006; HENRICKS et al., 1998; MENDEZ et al., 2012; SILVA et al., 2011a), seu mecanismo de ação e de interação com outras substâncias no processo de criotolerância espermática suína ainda é pouco conhecido. Assim, estudos que elucidem esses mecanismos e interações do IGF-I poderiam ser utilizados para melhor compreender a resposta celular frente à criopreservação e produzir espermatozoides criopreservados de melhor qualidade.

## 2.6 A Glutathiona Reduzida (GSH)

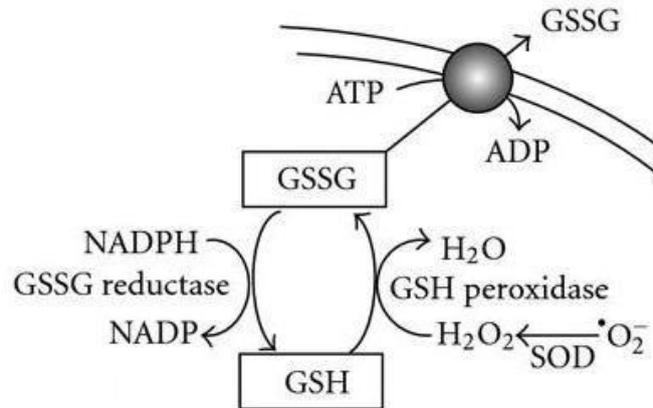
A GSH (*L*- $\gamma$ -glutamil-*L*-cistenilglicina) é um tripeptídeo que possui um grupo tiol distribuído abundantemente nas células dos mamíferos. Apresenta várias funções, dentre elas a ação protetora contra danos causados pelo estresse oxidativo, tornando-o vital para a manutenção do balanço REDOX intracelular (JACOB et al., 2003). Além disso, pode manter a estabilidade da estrutura nucleoprotéica e, dessa forma, levar a célula a uma maior criotolerância e longevidade (YESTE et al., 2013a).

A síntese da GSH é regulada por meio da regulação da enzima gama-glutamil cisteinil sintetase ( $\gamma$ GSC), na qual o GSH exerce *feedback* negativo (Lu, 2013). É sintetizado de acordo com a biodisponibilidade dos aminoácidos, principalmente da cisteína, a qual apresenta em sua estrutura o enxofre, formador do grupo tiol. Esse grupo vai conferir à glutathiona a capacidade de desempenhar papel importante no mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo intracelular e em outras funções, tais como redução de cadeias dissulfeto, transporte de aminoácidos, participação na síntese proteica e em processos de desintoxificação (MARTÍNEZ SARRASAGUE et al., 2006).

A principal função do GSH no sêmen é seu caráter antioxidante, mais especificamente como um redutor intracelular (JACOB et al., 2003; VALENÇA; GUERRA, 2007). Desempenha papel importante no mecanismo de defesa ao estresse oxidativo (BETTERIDGE, 2000), este gera a peroxidação lipídica, que leva ao vazamento de enzimas intracelulares, danos ao DNA espermático e perda de motilidade (WHITE, 1993). Uma vez que o espermatozoide suíno tem um elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados tornando-os muito susceptíveis à peroxidação lipídica (CEROLINI et al., 2000).

A glutathiona está presente na maioria das células, na forma reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG). A GSH é utilizada pela enzima glutathiona peroxidase (GPx) para reduzir, por exemplo, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água, formando a GSSG. Posteriormente, a GSSG é reduzida a GSH pela glutathiona redutase, utilizando NADPH como cofator (GADEA et al., 2011) (Figura 3).

Figura 3: Mecanismo de ação da glutatona para inativação do peróxido de hidrogênio.



Fonte: Modificado de Barros (2007).

O nível de GSH nos espermatozoides e no plasma seminal varia de acordo com as espécies. Em suínos, o nível de GSH presente nos espermatozoides é relativamente baixo em comparação com as demais espécies (LI, 1975). Nos espermatozoides de suíno a média de GSH é de 0,03 nmol/10<sup>8</sup> espermatozoides, contra 5,3 nmol/10<sup>9</sup> espermatozoides em humanos, e 2,93 nmol/10<sup>8</sup> espermatozoides em bovino (AGRAWAL; VANHA-PERTTULA, 1988). No plasma seminal suíno, as concentrações encontradas foram de 185,8 µM (STRZEZEK et al., 1999), contra 1,4 µM em humanos e 19 µM em touros (AGRAWAL; VANHA-PERTTULA, 1988).

O processo de criopreservação do sêmen está associado com a redução dos níveis de GSH citoplasmático (GADEA; SELLÉS; MARCO; 2004) e, conseqüentemente, maior susceptibilidade ao estresse oxidativo. A adição de GSH ao sêmen criopreservado mantém o balanço REDOX intracelular (JACOB et al., 2003) e a manutenção da estabilidade da estrutura nucleoproteica (MALO et al., 2010; PEREIRA et al., 2014; YESTE et al., 2014) aumentando a qualidade do sêmen criopreservado. Entretanto, resultados contraditórios podem ser encontrados na literatura (BAUMBER et al., 2003; CÂMARA et al., 2011; GADEA; SELLÉS; MARCO, 2004; SILVA et al., 2011b), demonstrando que o efeito da GSH parece ser dose-dependente.

No espermatozoide suíno notam-se níveis relativamente baixos de GSH em comparação às demais espécies (LI, 1975), sugerindo menor atividade desse sistema no processo de proteção antioxidante. Assim, para diminuir os danos causados pela criopreservação, o GSH tem sido comumente adicionado aos meios de congelamento de

sêmen (GIARETTA et al., 2015; YESTE et al., 2014). Dessa maneira, a adição dessa substância aos meios de congelamento pode diminuir os danos induzidos pelos radicais livres aos espermatozoides e melhorar a qualidade do sêmen suíno após o descongelamento.

### **3 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Apesar de a criopreservação ser o único método para a preservação de espermatozoides por tempo indeterminado, esse induz grandes alterações na função espermática. Resulta em crio-lesões que podem comprometer a sobrevivência dos espermatozoides e diminuir o desempenho reprodutivo, tornando essa técnica restrita aos programas de melhoramento genético. Portanto, a associação de substâncias com funções protetoras ao espermatozoide durante a técnica de criopreservação torna-se importante para reduzir as crioinjúrias e aumentar a viabilidade espermática após o procedimento.

Sendo o GSH um importante antioxidante e estabilizador da estrutura nucleoprotéica e o IGF-I capaz de auxiliar no processo de modulação pós-traducionais, de fosforilação e desfosforilação de proteínas relacionadas à resposta celular frente aos desafios causados pela criopreservação, a utilização dessas substâncias associadas pode trazer resultados satisfatórios para o espermatozoide criopreservado e melhorar a eficiência dos protocolos de congelamento de sêmen suíno utilizados.

## REFERÊNCIAS

- Associação Brasileira dos Criadores de Suínos (ABCS). Mapeamento da Suinocultura Brasileira, 1ª edição, Brasília, 29 nov. 2016. Disponível em: <[www.abcs.org.br](http://www.abcs.org.br)> Acesso em 14 nov. 2016.
- AGARWAL, A.; MAKKER, K.; SHARMA, R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. **American Journal of Reproductive Immunology**, New York, v. 59, n. 1, p. 2-11, Jan. 2008.
- AGRAWAL, Y. P.; VANHA-PERTTULA, T. Glutathione, l-glutamic acid and gammaglutamyl-transferase transpeptidase in the bull reproductive tissues. **International Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 11, n. 2, p. 123-131, Apr. 1988.
- ANAZETTI, M. C; MELO, P. S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa Online**, Campinas, v. 1, n. 1, p. 37-58, Jan. 2007.
- ANTUNES, R. C. Avanço tecnológico e aplicabilidade da técnica de congelamento de sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 1, p. 60-63, Jan. 2007.
- APARICIO, I. M. et al. Porcine sperm motility is regulated by serine phosphorylation of the glycogen synthase kinase-3alpha. **Biology of Reproduction**, Cambridge, v. 134, n. 3, p. 435- 444, Sept. 2007.
- AQUILA, S. et al. Estrogen receptor (ER) alpha and ER beta are both expressed in human ejaculated spermatozoa: evidence of their direct interaction with phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt pathway. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, New York, v. 89, n. 3, p. 1443-1451, Mar. 2004.
- BALDI, E. et al. Signal transduction pathways in human spermatozoa. **Journal Reproduction Immunology**, Limerick, v. 53, n. 1-2, p. 121-131, Jan. 2002.
- BALL, B.A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 107, n. 3-4, p.257- 267, Sept. 2008.
- BARROS, P. M. H. Estresse oxidativo e integridade do DNA em sêmen resfriado de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*). 2007. 102p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- BATHGATE, R. Antioxidant mechanisms and their benefit on post-thaw boar sperm quality. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 46, n. 2, p. 23–25, Sept. 2011.
- BAUMBER, J. et al. Reactive Oxygen Species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 4, n. 4, p.

621- 628, Aug. 2003.

BETARELLI, R. P. Efeitos da glutathiona reduzido sobre os processos de capacitação e reação acrossômica *in vitro* em sêmen suíno refrigerado. 2016. 27-30p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2016.

BETTERIDGE, D. J. What is oxidative stress? **Metabolism-clinical and experimental**, Philadelphia, v. 49, n. 2, p. 3-8, Feb. 2000.

BILODEAU, J. F. et al. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 55, n. 3, p. 282–288, Mar. 2000.

BIRKENKAMP, K. U.; COFFER, P. J. Regulation of cell survival and proliferation by the FOXO (Forkhead box, class O) subfamily of Forkhead transcription factors. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 31, n. 1, p. 292-297, Feb. 2003.

BORTOLOZZO, F. P. et al. **Suinocultura em ação**: inseminação artificial na suinocultura tecnificada. Porto Alegre: Pallotti, p. 185, 2005.

BREZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E. et al. Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. **Biological Trace Element Research**, London, v. 47, n. 1-3, p. 69–74, Mar. 1995.

BUCAK, M. N. et al. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. **Theriogenology**, Los Altos, v. 67, n. 5, p. 1060-1067, Mar. 2007.

BUCAK, M. N.; ATESSAHIN, A.; YUCE, A. Effect of antioxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 75, n. 2-3, p. 128-134, Mar. 2008.

BUCAK, M. N. et al. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: Antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 61, n. 3, p. 248-253, Dec. 2010.

CÂMARA, D.R. et al. Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. **Theriogenology**, Los Altos, v. 76, n. 2, p. 342-350, Jul. 2011.

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

CEROLINI, S. et al. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 58, n.

1-2, p. 99–111, Feb. 2000.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica ilustrada**. 3a ed. Porto Alegre: Artmed; 2006.

CHATTERJEE, S.; DE LAMIRANDE, E.; GRAGNON, C. Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. **Molecular Reproduction Development**, New York, v. 60, n. 4, p. 498-506, Dec. 2001.

CHAVES, J.; WASIF SAIF, M. IGF system in cancer: from bench to clinic. **Anti-Cancer Drugs**, Oxford, v. 22, n. 3, p. 206-212, Mar. 2011.

CHRISTENSEN, P.; PARLEVLIT, J.; BUITEN, A. Ultrastructure of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. In: International symposium on equine reproduction, Caxambú. **Proceedings...** Caxambú: ISER, p.197-198, 1994.

CORCINI, C. D. et al. 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**, Amsterdam, v. 145, n. 1-3, p. 28-33, May. 2012.

CUASNICU, P. S. et al. Molecular mechanisms involved in mammalian gamete fusion. **Archive Medical Research**, New York, v. 32, n. 6, p. 614-618, Nov-Dec. 2001.

CUI, C. et al. Effect of vitrification on mitochondrial membrane potential in human metaphase II oocytes. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, Amsterdam, v. 29, n. 10, p. 1045–1050, Oct. 2012.

ERATA, G. O. et al. The role of heat shock protein 70 (HSP 70) in male infertility: is it a line of defense against sperm DNA fragmentation? **Fertility and Sterility**, New York, v. 90, n. 2, p. 322-327, Aug. 2008.

ESTRADA, E. et al. Supplementing cryopreservation media with reduced glutathione increases fertility and prolificacy of sows inseminated with frozen-thawed boar semen. **Andrology**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 88-99, Jan. 2014.

FERNÁNDEZ-NOVELL, J. M. et al. Glucose and fructose as functional modulators of overall dog, but not boar sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, Australia, v. 23, n. 3, p. 468-480, Mar. 2011.

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

FLORES, E. et al. Freezing–thawing induces alterations in histone H1-DNA binding and the breaking of protein–DNA disulphide bonds in boar sperm. **Theriogenology**, Los Altos,

v. 76, n. 8, p. 1450–1464, Nov. 2011.

FORD, W. C. L. Regulation of sperm functions by reactive oxygen species. **Human Reproduction**, Oxford, v. 10, n. 5, p. 387-399, Oct. 2004.

GADEA, J. et al. Decrease in glutathione content in boar Sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. **Theriogenology**, Los Altos, v. 62, n. 3-4, p. 690–701, Aug. 2004.

GADEA, J. et al. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 62, n. 1, p. 40-46, Feb. 2011.

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

GANCARCZYK, et al. Aromatization and antioxidant capacity in the testis of seasonally breeding bank voles: effects of LH, PRL, and IGF-I. **Theriogenology**, Los Altos, v. 65, n. 7, p. 1376-1391, Apr. 2006.

GANGWAR, D. K.; ATREJA, S. K. Signaling Events and Associated Pathways Related to the Mammalian Sperm Capacitation. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 50, n. 5, p. 705-711, Oct. 2015.

GIARETTA, E. et al. Combining reduced glutathione and ascorbic acid has supplementary beneficial effects on boar sperm cryotolerance. **Theriogenology**, Los Altos, v. 83, n. 3, p. 399-407, Feb. 2015.

HENRICKS, D. M. et al. Identification of insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: influence on sperm motility. **Biology of Reproduction**, New York, v. 59, n. 2, p. 330-337, Aug. 1998.

HIGASHI, Y. et al. Aging atherosclerosis and IGF-I. **The Journals of Gerontology - Biological Sciences and Medical Sciences**, Washington, v. 67, n. 6, p. 626-639, Apr. 2012.

HIRAI, L. J. et al. Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. **Theriogenology**, Los Altos, v. 58, n. 7, p. 1349-1360, Oct. 2001.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 62, n. 1-3, p. 3–22, Aug. 2000.

JACOB, C. et al. Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function. **Angewandte Chemie International**, Weinheim, v. 42, n. 39, p. 4742–4758, Oct. 2003.

- JOHNSON, L. A. et al. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 62, n. 1-3, p. 143-172, Aug. 2000.
- KANKOFER, M. et al. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. **Theriogenology**, Los Altos, v. 63, n. 5, p.1354-1365, Mar. 2005.
- KUMARESAN, A. et al. Preservation of boar semen at 18 °C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 110, n. 1-2, p. 162-171, Jan. 2009.
- LEAHY, T.; GADELLA, B. M. Capacitation and capacitation-like sperm surface changes induced by handling boar semen. **Reproduction Domestic Animal**, Berlin, v. 46, n. 2, p. 7- 13, Sept. 2011.
- LEWIS, S. E.; AITKEN, R. J. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 322, n. 1, p. 33-41, Oct. 2005.
- LI, T. K. Glutathione and thiol content of mammalian spermatozoa and seminal plasma. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 12, n. 5, p. 641-646, Jun. 1975.
- LIN, T. Regulation of Leydig cell function by insulin-like growth factor-I and binding proteins. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 16, n. 3, p. 193-196, May-Jun. 1995.
- LU, S. C. Glutathione synthesis. **Biochemical et Biophysical Acta-General Subjects**, Amsterdam, v. 1830, n. 5, p. 3143-3153, May. 2013.
- MACPHERSON, M. L. et al. Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-2 and-5 in equine seminal plasma: association with sperm characteristics and fertility. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 67, p. 648-654, Aug. 2002.
- MALO, C. et al. Comparing sugar type supplementation for cryopreservation of boar semen in egg yolk based extender. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 61, n. 1, p. 17-21, Aug. 2010.
- MANEESH, M.; JAYALEKSHIMI, H. Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, New Delhi, v. 21, n. 2, p. 80-89, Sept. 2006.
- MARTINELLI, JR. C. E; CUSTÓDIO, R. J; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H. Fisiologia do Eixo GH-Sistema IGF. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, São Paulo, v. 52, n. 5, p. 717-725, Jul. 2008.
- MARTÍNEZ SARRASAGUE, M. et al. Current concepts of glutathione metabolism using stable isotopes for assessing homeostasis. **Acta Bioquímica Clínica Latino**, Buenos Aires, v. 40, n. 2, p. 45-54, 2006.

- MEDRANO, A. et al. Utilization of different monosaccharides by boar sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 39, n. 4, p. 259-262, Oct. 2004.
- MEDRANO, A. et al. Utilization of citrate and lactate through a lactate dehydrogenase and ATP-regulated pathway in boar spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 73, n. 3, p. 369-378, Mar. 2006.
- MENDEZ, M. F. B. et al. Effect of the addition of IGF-I and vitamin E to stored boar semen. **Animal Cambridge**, Cambridge, v. 7, n. 5, p. 1-6, May. 2012.
- MEYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 Chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 62, n. 6, p. 670-684, Mar. 2005.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger – **Principles of Biochemistry**. 4<sup>a</sup> edition. Worth Publishers, New York, p. 527-566, 2004.
- NORDBERG, J.; ARNER, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, Oxford, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, Dec. 2001.
- PAQUIGNON, M. et al. Tecnología de la congelación de la semence de verrat: étude in vitro. **Journées Rech Porcine en France**, Paris, v. 6, n.1, p. 71-76, Oct. 1974.
- PEGG, D. E. Cryopreservation and freeze-drying protocols methods. **Molecular Biology**, Ed. Totowa: Humana Press Inc., p. 348, 2007.
- PEREIRA, B. A. et al. Effect de l'acide chlorogénique sur la peroxydation lipidique et la capacité antioxydante du sperme de verrat. **In: Journées Recherche Porcine**, 46, 2014, Paris. n.46, p. 293-294, 2014.
- POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification e dehydration at low temperatures. **Nature**, London, v. 164, n. 4172, p. 164-668, Oct. 1949.
- RAMIÓ-LLUCH, L. et al. Oligomycin A-inhibition of mitochondrial ATP-synthase activity suppresses boar sperm motility and in vitro capacitation achievement without modifying overall sperm energy levels. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 26, n. 6, p. 883-897, July 2013.
- ROCA, J. et al. Approaches towards efficient use of boar semen in the pig industry. **Reproduction of Domestic Animals**, Berlin, v. 46, n. 2, p. 79-83, Sept. 2011.
- ROCHA, L. G. et al. Immunoprecipitation studies anti-HSP70 confirms the relevance of serine-phosphorylation in boar sperm cryotolerance. In: XX Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Uberlândia-MG. **Anais...**, Uberlândia-MG, Brasil, 2013.

RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; ESTRADA, E. Artificial insemination in boar reproduction. In: BONET, S. et al. **Boar reproduction**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, p. 589-608, 2013.

ROSENDAL, L. et al. Physical capacity influences the response of insulin-like growth factor and its binding proteins to training. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.93, n. 5, p. 1669-1675, Nov. 2002.

ROSER, J. F. Endocrine and paracrine control of Sperm production in stallions. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 68, n. 3, p. 139-151, Dec. 2001.

RUSSO, V. C. et al. The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 26, n. 7, p. 916-943, Dec. 2005.

SCHULTE, R. T. et al. Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, New York, v. 27, n. 1, p. 3-12, Jan. 2010.

SEGER, R.; KREBS, E. G. The MAPK signaling cascade. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 9, n. 9, p. 726-735, 1995.

SELVARAJU, S. et al. Influence of IGF-I on buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa motility, membrane integrity, lipid peroxidation and fructose uptake in vitro. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 113, n. 1-4, p. 60-70, Jul. 2009.

SHARMA, R.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, Oxford, v. 48, n. 6, p. 835-850, Dec. 1996.

SIKKA, S. C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 25, n. 1, p. 5-18, Feb. 2004.

SILVA, D. M. et al. Addition of IGF-I to storage - cooled boar semen and its effect on sperm quality. **Growth Hormone & IGF Research**, London, v. 21, n. 6, p. 325-330, Dec. 2011a.

SILVA, S.V. et al. In vitro and in vivo evaluation of ram sperm frozen in tris egg-yolk and supplemented with superoxide dismutase and reduced glutathione. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 46, n. 5, p. 874-881, Oct. 2011b.

SILVA, J. R.; FIGUEIREDO, J. R.; VAN DEN HURK, R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. **Theriogenology**, Los Altos, v. 71, n. 8, p. 1193-1208, May. 2009.

SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, Los Altos, v. 65, n. 5, p. 958-978, Mar. 2006.

SMITH, R. et al. Total antioxidant capacity of human seminal plasma. **Human Reproduction**, Oxford, v. 11, n. 11, p. 1655-1660, Aug. 1996.

SONDERMAN, J. P.; LUEBBE, J. J. Semen production and fertility issues related to differences in genetic lines of boars. **Theriogenology**, Los Altos, v. 70, n. 8, p. 1380-1383, Nov. 2008.

SQUIRES, E. L. et al. Factors affecting fertility of frozen-thawed spermatozoa. **In: Cooled and frozen stallion semen**, Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, Bulletin n. 9, p. 61- 80, 1999.

TAVILANI, H. et al. Relationship between seminal antioxidant enzymes and the phospholipid and fatty acid composition of spermatozoa. **Reproduction Biomed Online**, Cambridge, v. 16, n. 5, p. 649–656, May. 2008.

THOMPSON, J. A.; FRANKLIN, C. C. Enhanced glutathione: biosynthetic capacity promotes resistance to AS-induced apoptosis. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 193, n. 1, p. 33-40, Mar. 2010.

TVRDA, E. et al. Impact of oxidative stress on male fertility – a review. **Acta Veterinarian Hungarian**, Budapest, v. 59, n. 4, p. 465-484, Nov. 2011.

USDA- United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service. 2015. **Crop Production**, 2015. Summary, January, 2016. Disponível em: <<https://www.usda.gov/nass/PUBS/TODAYRPT/cropan16.pdf> > Acesso em 10 nov. 2016.

VALENÇA, R. M. B.; GUERRA, M. M. Espécies reativas ao oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Curitiba, v. 31, n. 1, p. 47-53, Jan-Mar. 2007.

VICKERS, M. H. et al. IGF-I treatment increases motility and improves morphology of immature spermatozoa in the GH-deficient dwarf rat. **Growth Hormone IGF Research**, London, v. 9, n. 4, p. 236-240, Aug. 1999.

VINCENT, A. M.; FIELDMAN, E. L. Control of cell survival by IGF signaling pathways. **Growth Hormone & IGF Research**, London, v. 12, n. 4, p. 193-197, Aug. 2002.

WALTERS, E. M. The history of sperm cryopreservation. In: PACEY, A. A.; TOMLINSON, M. J. (Ed.). **Sperm banking; theory and practice**. Cambridge: Cambridge University Press, 2009.

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

WESTENDORF, P. et al. Zur tiefgefrierung von ebersperma. **Deutsche Tierärztliche, Wochenschrift**, German, v. 82, n. 7, p. 261-267, Jul. 1975.

WHITE, I. G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reproduction Fertility and Development**, East Melbourne, v. 6, n. 5, p. 639-658, 1993.

YESTE, M. et al. Reduced glutathione and procaine hydrochloride protect the nucleoprotein structure of boar spermatozoa during freeze-thawing by stabilizing disulfide bonds. **Reproduction Fertility and Development**, East Melbourne, v. 25, n. 7, p. 1036-1050, Oct. 2013a.

YESTE, M. et al. Good and bad freezability boar ejaculates differ in the integrity of nucleoprotein structure after freeze-thawing but not in ROS levels. **Theriogenology**, Los Altos, v. 79, n. 6, p. 929–939, Apr. 2013b.

YESTE, M. et al. The improving effect of reduced glutathione on boar sperm cryotolerance is related with the intrinsic ejaculate freezability. **Cryobiology**, New York, v. 68, n. 2, p. 251- 261, Apr. 2014.

YESTE, M. et al. Intracellular calcium movements of boar spermatozoa during in vitro capacitation and subsequent acrosome exocytosis follow a multiple-storage place, extracellular calcium-dependent model. **Andrology**, Philadelphia, v. 3, n. 4, p. 729-747, June. 2015.

YESTE, M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. **Theriogenology**, Los Altos, v. 85, n. 1, p. 47-64, Jan. 2016.

## SEGUNDA PARTE – ARTIGO

ADIÇÃO DE FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA TIPO I (IGF-I)  
E GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) AO SÊMEN SUÍNO CRIOPRESERVADO

Carla Oliveira Resende <sup>1</sup>, Rafael Pedroso Betarelli <sup>1</sup>, Marcio Gilberto Zangeronimo <sup>1\*</sup>,  
Joan Enric Rodrigues Gil <sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, CEP:37200-000,  
Lavras, Minas Gerais, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Medicina e Cirurgia Animal, Universidade Autônoma de Barcelona,  
Espanha.

[\\*zangeronimo@dmv.ufla.br](mailto:*zangeronimo@dmv.ufla.br)

## RESUMO

Objetivou-se avaliar a influência da adição de GSH ao meio de congelamento do sêmen suíno, adicionado ou não de IGF-I ou anti-IGF-I, sobre a qualidade do sêmen suíno congelado. A adição de IGF-I e de seu anticorpo aumentou ( $P<0,05$ ) a resistência osmótica e a integridade de acrossoma do sêmen suíno fresco incubado por 120 minutos. Após 24 horas de resfriamento, essas substâncias aumentaram ( $P<0,05$ ) a porcentagem de células com maior atividade mitocondrial e reduziram a porcentagem de células com elevados níveis de superóxidos após 120 minutos de incubação. No entanto, o anti-IGF-I reduziu ( $P<0,05$ ) a porcentagem de espermatozoides viáveis e tanto o IGF-I quanto o anti-IGF-I diminuíram ( $P<0,05$ ) a intensidade de células com alto potencial mitocondrial de membrana em relação ao controle aos 10 minutos de incubação. Após o descongelamento e aos 10 minutos de incubação, o GSH, associado ou não ao IGF-I ou anti-IGF-I diminuiu ( $P<0,01$ ) a integridade do acrossoma em relação ao controle. Quando associado, o GSH diminuiu ( $P<0,05$ ) a resistência osmótica e a porcentagem de espermatozoides com elevada atividade mitocondrial. Menores valores de peróxidos e superóxidos intracelulares foram observados ( $P<0,01$ ) quando o GSH foi associado ao IGF-I ou anti-IGF-I. Aos 120 minutos de incubação, o GSH associado ou não reduziu ( $P<0,01$ ) a porcentagem de espermatozoides com acrossoma intacto, a intensidade de células com elevado teor de superóxidos e a porcentagem de espermatozoides com elevado teor de peróxidos. Conclui-se que a adição de IGF-I ou de seu anticorpo melhora a qualidade do sêmen fresco diluído e aumenta o potencial antioxidante tanto do sêmen resfriado quanto do sêmen descongelado.

**Palavras-chave:** Antioxidante. Congelamento de sêmen. Qualidade seminal. Reprodução. Suinocultura

## 1 **1. Introdução**

2

3 A criopreservação é um método eficaz para a preservação de gametas por tempo  
4 indeterminado (Yeste, 2016). Entretanto, essa biotecnologia ainda não está consolidada na  
5 espécie suína, principalmente devido à dificuldade no congelamento do sêmen (Watson,  
6 2000). Atualmente, menos de 1% das inseminações artificiais no mundo são com sêmen suíno  
7 congelado (Rodríguez-Gil; Estrada, 2013), devido à redução da taxa de parição na ordem de  
8 10 a 20% e cerca de dois a três leitões a menos por leitegada, quando comparado ao sêmen  
9 resfriado (Roca et al., 2011).

10 O principal problema com o sêmen congelado está relacionado às injúrias de  
11 membranas que ocorrem durante o processo de criopreservação. Sabe-se que o  
12 espermatozoide suíno contém elevados níveis de fosfolipídios insaturados e menores níveis de  
13 colesterol quando comparado às demais espécies (Casas; Flores, 2013). Com isso, ocorre  
14 maior fluidez e, conseqüentemente, maior susceptibilidade a injúrias na membrana  
15 plasmática, a qual exerce um papel importante no processo de fecundação (Cuasnicu et al.,  
16 2001). Além disso, alterações no núcleo do espermatozoide em virtude da desestabilização da  
17 estrutura nucleoprotéica podem comprometer a capacidade fecundante dessas células devido à  
18 fragmentação do DNA (Flores et al., 2011; Yeste et al., 2013a).

19 Dessa forma, diversos estudos têm avaliado o uso de substâncias nos meios de  
20 congelamento e descongelamento capazes de influenciar de maneira positiva as respostas  
21 celulares frente aos desafios da criopreservação. Dentre essas substâncias, a adição de  
22 antioxidantes como a glutathiona reduzida (GSH), além de ser vital para a manutenção do  
23 balanço REDOX intracelular (Jacob et al., 2003) e ajudar a manter a estabilidade da estrutura  
24 nucleoprotéica (Malo et al., 2010; Pereira et al., 2014; Yeste et al., 2014), poderia melhorar a  
25 qualidade do sêmen criopreservado. Entretanto, resultados contraditórios são encontrados na

26 literatura (Baumber et al., 2003; Câmara et al., 2011; Gadea et al., 2004), sugerindo que o  
27 efeito dessa substância seja dose-dependente, podendo ainda ser influenciado pelo momento  
28 em que é adicionado durante o processamento das doses inseminantes ou pelas características  
29 do sêmen.

30 Sabe-se que o fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) é uma  
31 substância natural encontrada no sêmen (Zangeronimo et al., 2013). O IGF-I destaca-se pelo  
32 seu efeito regulador da fosforilação de proteínas e capacidade de acelerar o metabolismo  
33 energético das células espermáticas (Macpherson et al., 2002). A adição de GSH em doses  
34 inseminantes contendo diferentes quantidades de IGF-I não tem sido avaliada até então. O  
35 conhecimento dos mecanismos relacionados com o uso do GSH poderia resultar em  
36 espermatozoides com maior criotolerância e longevidade, contribuindo não só para o uso do  
37 sêmen congelado em programas de IA, mas também otimizar a disseminação da genética dos  
38 reprodutores. Dessa forma, objetivou-se verificar a influência da adição de GSH ao meio de  
39 congelamento do sêmen suíno, na presença ou ausência de IGF-I, sobre a qualidade do sêmen  
40 suíno congelado.

41

## 42 **2. Material e métodos**

43

### 44 *2.1 Coleta e processamento do sêmen*

45 Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Fisiologia e  
46 Farmacologia Veterinária da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras-MG, Brasil,  
47 nos meses de janeiro a março de 2017. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética  
48 no Uso de Animais, sob o protocolo número 043/14.

49 Oito ejaculados provenientes de oito varrões das raças Duroc e Large White, todos de  
50 fertilidade comprovada, provenientes de uma granja comercial foram utilizados. Os animais

51 permaneceram em baias individuais de alvenaria com 2,5 m de comprimento por 2 m de  
52 largura, onde receberam diariamente 3,0 kg de ração específica para varrões em atividade  
53 reprodutiva, dividido em dois arraçoamentos e água à vontade. A coleta do sêmen foi  
54 realizada pelo método da mão enluvada, sempre no período da manhã, uma hora após o  
55 arraçoamento. Antes da coleta, foi realizada a higienização do prepúcio dos animais por meio  
56 de pressão manual caudo-cranial no sentido da abertura prepucial e posterior limpeza da  
57 região. Apenas a fração rica em espermatozoides foi utilizada, sendo a fração gelatinosa  
58 separada por meio de uma camada tripla de gaze/papel filtro e descartada.

59 Após a coleta, o sêmen foi diluído em BTS (Beltsville Thawing Solution – Minitub  
60 Brasil) na proporção de 1:1 e transportados para o laboratório de análise do sêmen. Em  
61 seguida, com auxílio da câmara de Neubauer, a concentração espermática foi ajustada com  
62 BTS, de modo que cada dose inseminante de 100 mL contivesse 3 bilhões de  
63 espermatozoides. O sêmen diluído foi então dividido em três grupos, sendo o primeiro o  
64 grupo controle (sêmen diluído), o segundo adicionado de IGF-I humano recombinante  
65 (Sigma-Aldrich - Recombinant Human IGF-I 50UG) na concentração de 30 ng/ml (Mendez et  
66 al., 2012) e o terceiro adicionado de anti-IGF-I (Invitrogen IGF-I Antibody – hospedeiro  
67 camundongo 100 uL) na concentração de 60 ng/ml. Essa quantidade de anticorpo foi  
68 determinada após a quantificação de IGF-I endógeno (IGF-I ELISA Kit 1 x 96 well –  
69 Raybiotech, Norcross-GA, USA) em amostras de sêmen previamente coletada dos animais  
70 experimentais. O IGF-I e o anti-IGF-I foram adicionados logo após a coleta e diluição do  
71 sêmen. Posteriormente, as amostras foram resfriadas e mantidas a 17 °C durante 24 horas.  
72 Após esse período, alíquotas de 10 mL de cada amostra do sêmen foram aquecidas em banho-  
73 maria a 37 °C e avaliadas aos 10 e aos 120 minutos de incubação.

74 O delineamento experimental foi em blocos ao acaso (ejaculados) com seis  
75 tratamentos e oito repetições. Todas as análises foram feitas em triplicatas. Foi avaliada a

76 motilidade total e progressiva, morfologia espermática, teste de resistência osmótica,  
77 viabilidade espermática, integridade do acrossoma, permeabilidade de membrana, atividade  
78 mitocondrial e níveis de peróxido intracelular e superóxido.

79

## 80 2.2 Criopreservação e descongelamento do sêmen

81 A criopreservação foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Westendorf  
82 et al. (1975) e modificada por Yeste et al. (2013b). O sêmen resfriado a 17°C por 24 horas,  
83 adicionado ou não de IGF-I ou anti-IGF-I, foram centrifugados a 17°C em 600 g por 5  
84 minutos. Os *pellets* foram separados dos sobrenadantes e diluídos em um meio LEY  
85 (contendo 80% de solução de lactose a 11% e 20% de gema de ovo) para o congelamento,  
86 adicionado ou não de GSH a 5 mM (Giaretta et al., 2015), resultando em seis grupos  
87 experimentais por ejaculado: controle, IGF-I, anti-IGF-I, GSH, GSH + IGF-I e GSH + anti-  
88 IGF-I. A diluição foi feita de modo que a concentração final fosse de  $1,5 \times 10^9$   
89 espermatozoides/ml. O cálculo da quantidade do diluente foi feito com auxílio da câmara de  
90 Neubauer.

91 As amostras diluídas foram então resfriadas a 5°C por 120 minutos e,  
92 subsequentemente, diluídas em meio LEYGO (92,5% LEY, 6% glicerol e 1,5% *Orvus ES*  
93 *Paste*) a uma concentração final de  $1 \times 10^9$  espermatozoides/ml. Em seguida, as amostras  
94 foram envasadas em palhetas de 0,5 ml, em um total de oito palhetas por tratamento.  
95 Posteriormente, as palhetas foram transferidas a um congelador programável (IceCube 14 S-  
96 A, Minitub do Brasil, Porto Alegre-RS, Brasil). A curva de congelamento utilizada foi  
97 ajustada da seguinte forma: -6 °C/min de 5 a -5 °C (100 segundos); -39°C/min de -5 a -80 °C  
98 (113 segundos), mantida durante 30 segundos a -80 °C e congelada -60 °C/min de -80 °C a -  
99 150 °C (70 segundos) (Yeste et al., 2013a). Por fim, as palhetas foram imersas em nitrogênio  
100 líquido e armazenadas até a data das análises.

101 O conteúdo das palhetas foi descongelado após 15 dias, a 37 °C por 20 segundos. Em  
102 seguida, o sêmen descongelado foi diluído em BTS na proporção final de 1:4 (Casas et al.,  
103 2010) e incubados em banho-maria a 37 °C. As avaliações da qualidade espermática e o  
104 delineamento experimental foram os mesmos descritos para o sêmen resfriado, porém, foram  
105 considerados agora seis tratamentos.

106

### 107 2.3 Avaliações microscópicas

108 A motilidade espermática foi avaliada em um sistema de análise computadorizado do  
109 sêmen (CASA – *Sperm Class Analyzer SCA 5.0*, Microptic, Barcelona, Espanha), acoplado a  
110 um microscópio de contraste de fases com placa aquecedora (Olympus CX31, Olympus -  
111 Tokyo, Japão). Para realização do teste, 3,0 µL da amostra de sêmen foi depositado em uma  
112 lâmina específica (Leja<sup>®</sup> 20 micron - Microptic, Barcelona, Espanha), pré-aquecida a 37 °C.  
113 Um total de cinco campos visuais aleatórios foi avaliado para cada amostra.

114 Para avaliar a resistência osmótica, uma alíquota de 100 µL de sêmen foi depositada  
115 em microtubo tipo *Eppendorf* com 900 µL de solução hiposmótica de citrato de sódio (pH de  
116 7,4) e outra alíquota depositada em microtubo com 900 µL de solução isosmótica de citrato de  
117 sódio (pH de 7,4) foram incubadas em banho-maria a 37 °C por 15 minutos. Em seguida, um  
118 esfregaço sobre lâmina foi realizado com uma gota de sêmen misturado a uma gota de corante  
119 eosina-nigrosina (Blom, 1950). A avaliação foi realizada em microscópio óptico (Olympus  
120 CX31, Olympus – Tokyo, Japão) em aumento de 400x. A integridade do acrossoma foi  
121 avaliada em um total de 100 espermatozoides contados aleatoriamente. Posteriormente, a  
122 integridade de acrossoma foi calculada através da porcentagem de alterações acrossômica  
123 observadas no meio isosmótico e no meio hiposmótico (Rodríguez-Gil; Rigau, 1996).

124 O total de alterações espermáticas foi avaliado após deposição de uma alíquota de 200  
125 µL de sêmen em 700 µL de solução formol-citrato a 3% (Pursel et al., 1972). Após

126 homogeneização, 10 µL da amostra foram depositadas entre lâmina e lamínula e avaliada 100  
127 células aleatórias em microscópio de contraste de fase (Olympus CX31, Olympus - Tokyo,  
128 Japão) em aumento de 1000x. Os dados foram expressos em porcentagem, considerando o  
129 número total de alterações detectadas em relação ao número total de células contadas. A  
130 alteração de acrossoma, de cabeça, de peça intermediária e de cauda foram contabilizadas.

131

#### 132 *2.4 Análises por Citometria de Fluxo*

133 Todas as informações sobre as análises de Citometria de Fluxo foram fornecidas pela  
134 Sociedade Internacional para o Avanço da Citometria (ISAC) (Lee et al., 2008). A  
135 concentração de espermatozoides em cada amostra foi previamente ajustada com BTS  
136 aquecido a 37 °C para  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL em um volume final de 0,5 mL. Em  
137 seguida, os espermatozoides foram corados com as combinações de cada fluorocromo  
138 (SYBR-14/ PI/ PNA-FIT/ H2DFCDA/ HE/ JC1/ YO-PRO-1), seguindo protocolos  
139 específicos de cada fluorocromo. Os fluorocromos utilizados para estas análises foram  
140 adquiridos da Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA) e diluídos de acordo  
141 com recomendações do fabricante.

142 As amostras foram analisadas através do Citômetro de Fluxo (Guava® EasyCyte HT,  
143 Merck-Millipore, Darmstadt, Alemanha). As informações sobre os eventos foram coletadas  
144 em arquivos de dados em modo de lista (LMD) e esses arquivos gerados foram então  
145 analisados usando o Cell Lab Quanta SC MPL Analysis Software (versão 1.0, Beckman  
146 Coulter). Nas avaliações de PNA-FITC / PI, H2DFCDA / PI e HE / YO-PRO-1, os dados  
147 foram corrigidos de acordo com o procedimento descrito por Petrunkina et al. (2010).

148 A viabilidade espermática foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Garner  
149 e Johnson (1995), utilizando o kit LIVE/DEAD®, com fluorocromo SYBR-14 e Iodeto de  
150 Propídio (PI). A integridade do acrossoma foi avaliada por incubação da amostra de sêmen

151 com lectina de *Arachis hypogaea* (aglutinina de amendoim, PNA) conjugado com  
152 isotiocianato de fluoresceína (FITC) e PI, de acordo com o procedimento descrito por Nagy et  
153 al. (2003).

154 Os níveis de peróxidos intracelulares ( $H_2O_2$ ) e superóxido ( $O_2^-$ ) foram  
155 determinados de acordo com o protocolo modificado a partir de Guthrie e Welch (2006),  
156 utilizando duas diferentes sondas fluorescentes sensíveis à oxidação. Para análise dos  
157 peróxidos, os espermatozoides foram corados com 2', 7' - diacetato diclorodihidrofluoresceína  
158 (H2DCFDA) e fluorocromo PI. Já para a análise de superóxidos, as amostras foram coradas  
159 com hidroetidina (HE) e YO-PRO®-1.

160 A avaliação da atividade mitocondrial foi realizada de acordo com a metodologia  
161 utilizada por Gillan et al. (2005), através de fluorocromo 5,5'- 6,6'- tetracloro- 1,1'- 3,3'-  
162 tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodeto (JC-1). Para a análise de permeabilidade de  
163 membrana foi utilizada a coloração com fluorocromo YO-PRO-1 e PI, segundo protocolo  
164 descrito por Rathi et al. (2001).

165

## 166 2.6 Análise estatística

167 Os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos (Shapiro Wilk). Quando  
168 necessário, os dados foram transformados utilizando a raiz quadrada. Em seguida, foram  
169 submetidos à análise de variância (ANAVA). Para as variáveis que atingiram as premissas da  
170 ANAVA foi utilizado o teste Tukey a 5% e as variáveis que não atingiram as premissas foram  
171 submetidas à análise não paramétrica, sendo as médias comparadas pelo teste de Friedman.  
172 Todas as análises foram realizadas no programa estatístico Action versão 3.1 com  $\alpha = 5\%$ .

173

## 174 3. Resultados

175

176 *3.1 Sêmen fresco*

177 A quantidade livre de IGF-I endógena no sêmen diluído dos animais experimentais  
178 foi de (3,46±0,83 ng/mL). A adição de IGF-I e anti-IGF-I ao meio de diluição aumentou  
179 (P<0,05) a resistência osmótica e o número de espermatozoides viáveis com acrossoma  
180 intacto após 120 minutos de incubação (Tabela 1). Não houve influência (P<0,05) dessas  
181 substâncias nas demais características do sêmen avaliadas.

182

183 *3.2 Sêmen resfriado*

184 Com 10 minutos após o reaquecimento do sêmen, o anti-IGF-I reduziu (P<0,05)  
185 a porcentagem de espermatozoides viáveis. Tanto o IGF-I quanto o anti-IGF-I diminuíram  
186 (P<0,05) a intensidade de células com alto potencial mitocondrial de membrana (Tabela 2). Já  
187 com 120 minutos de incubação, houve (P<0,05) maior porcentagem de células com alto  
188 potencial mitocondrial de membrana com a adição dessas substâncias e menor intensidade de  
189 células com alto nível de superóxido. Não houve influência (P<0,05) dessas substâncias nas  
190 demais características do sêmen avaliadas.

191

192 *3.3 Sêmen descongelado*

193 Aos 10 minutos de incubação, o GSH associado ou não ao IGF-I ou anti-IGF-I  
194 diminuiu (P<0,01) a porcentagem de espermatozoides com acrossoma intacto (Tabela 3).  
195 Quando associado a ambas as substâncias, o GSH diminuiu (P<0,05) a resistência osmótica e  
196 a porcentagem de espermatozoides com elevada atividade mitocondrial quando comparado ao  
197 controle. Também houve redução (P<0,05) da porcentagem de espermatozoides com elevado  
198 teor de peróxidos, principalmente quando associado ao anti-IGF-I. Todas as substâncias  
199 adicionadas ao sêmen durante o processamento diminuíram (P<0,01) a intensidade de células  
200 com elevado nível de superóxidos. Entretanto, a maior redução foi observada com a

201 associação GSH + anti-IGF-I. Não houve efeito ( $P>0,05$ ) das substâncias utilizadas nas  
202 demais características do sêmen avaliadas.

203         Aos 120 minutos de incubação, o GSH associado ou não ao IGF-I ou anti-IGF-I  
204 reduziu ( $P<0,01$ ) a porcentagem de espermatozoides com acrossoma intacto, a intensidade de  
205 células com elevado teor de superóxidos e a porcentagem de espermatozoides com elevado  
206 teor de peróxidos (Tabela 4). Não houve efeito ( $P>0,05$ ) das substâncias utilizadas nas demais  
207 características do sêmen avaliadas.

208

#### 209 **4. Discussão**

210         Esse é o primeiro estudo a avaliar os efeitos da adição do GSH aos meios de  
211 congelamento do sêmen suíno, associado ou não à adição de IGF-I ou ao seu anticorpo anti-  
212 IGF-I ao sêmen fresco. A maioria dos estudos encontrados na literatura avaliou a adição do  
213 IGF-I como um ativador metabólico, adicionado no momento da diluição do sêmen fresco ou  
214 durante o reaquecimento das doses inseminantes (Mendez et al., 2012; Silva et al., 2011). No  
215 presente estudo, a adição do IGF-I ou de seu anticorpo apenas no momento da diluição do  
216 sêmen fresco se deve à necessidade de se avaliar o efeito da adição de GSH ao meio de  
217 congelamento para sêmen suíno contendo diferentes concentrações desse hormônio.

218         De uma maneira geral, sabe-se que o espermatozoide suíno é um dos mais sensíveis  
219 às variações de temperatura (Yeste et al., 2015), volume e composição dos meios de  
220 diluição e congelamento do sêmen (Watson, 1995). Além disso, as características seminais  
221 mudam de acordo com a raça, idade do animal, estado nutricional, estação do ano e até  
222 mesmo entre ejaculado do mesmo animal (Holt, 2000; Sonderman; Luebbe, 2008). Tais  
223 características dificultam a padronização de um protocolo de congelamento eficiente, sendo  
224 necessária melhor compreensão dos mecanismos de ação da célula espermática frente às  
225 injúrias causadas pelo congelamento.

226 O maior benefício da adição do GSH aos meios de congelamento é o aumento  
227 da capacidade antioxidante do sêmen descongelado (Giaretta et al., 2015; Yeste et al., 2014).  
228 Entretanto, no presente estudo, esse efeito só foi observado quando o GSH foi associado ao  
229 IGF-I ou ao anti-IGF-I, principalmente a esse último, sugerindo que exista alguma interação  
230 entre esses fatores. Sabe-se que o IGF-I é uma substância natural que pode ser encontrado no  
231 sêmen suíno em diferentes concentrações.

232 No presente estudo, os níveis de IGF-I analisados variaram de 2,42 a 5,15 ng/mL  
233 em varrões das raças Large White e Duroc. Hirai et al. (2001) obtiveram valores variando de  
234 8,4 a 22,2 ng/mL em varrões Pietrain, valores próximos aos observados por Lackey et al.  
235 (2002), de 5,0 até 25 ng/mL em varrões das raças Duroc e Yorkshire. Zangeronimo et al.  
236 (2013) observaram variações de 1,39 até 2,44 ng/mL em varrões de diferentes linhagens  
237 comerciais. Considerando a variação existente nos níveis desse hormônio no sêmen, os  
238 resultados do presente estudo obtidos com GSH podem explicar as diferenças encontradas  
239 entre diferentes trabalhos com essa substância (Baumber et al., 2003; Câmara et al., 2011;  
240 Estrada et al., 2014; Gadea et al., 2004).

241 Além disso, ejaculados de boa congelabilidade (maior resistência à  
242 criopreservação) apresentam maiores concentrações endógenas de GSH (Casas et al., 2010;  
243 Yeste et al., 2013a), reduzindo os benefícios conferidos pela adição dessa substância ao meio  
244 de diluição. No presente estudo, seis machos foram considerados de boa congelabilidade,  
245 uma vez que apresentaram motilidade maior que 40% após descongelamento e dois machos  
246 foram considerados de baixa congelabilidade.

247 Com relação à adição do IGF-I durante o processamento do sêmen, nenhum  
248 efeito pode ser observado após o descongelamento do mesmo. Já no sêmen fresco, a adição  
249 desse hormônio aumentou a resistência osmótica e o número de espermatozoides com  
250 acrossoma intacto. Após 24 horas de sua adição, houve aumento de células com alto potencial

251 mitocondrial e uma menor porcentagem de células com alto nível de superóxido. Silva et al.  
252 (2011) não encontraram diferenças na motilidade, resistência osmótica, viabilidade e  
253 anormalidades espermáticas, porém, observaram redução da atividade da glutathione  
254 peroxidase e da peroxidação lipídica no sêmen resfriado por 24 horas.

255 Mendez et al. (2012) também verificaram menores teores de dimaldialdeído ao  
256 adicionarem 30 ng/mL de IGF-I ao sêmen suíno. Esses resultados sugerem que o IGF-I pode  
257 estar envolvido nas vias de proteção antioxidante das células espermáticas. Entretanto, no  
258 presente estudo, embora efeitos positivos tenham sido observados no sêmen resfriado, esse  
259 resultado não foi suficiente para melhorar as demais características do sêmen descongelado  
260 apenas com adição do sistema IGF-I.

261 Ainda no presente estudo, os resultados obtidos com o IGF-I foram semelhantes  
262 aos obtidos com a adição de seu anticorpo, o anti-IGF-I. Isso sugere que, em vez de  
263 ativar os mecanismos hormonais mediados pelo IGF-I, a adição desse hormônio na dose de  
264 30 ng/mL pode ter inativado tais mecanismos. De fato, ao se analisar essa concentração  
265 de IGF-I no sêmen diluído, verifica-se que a mesma está bem acima das concentrações  
266 fisiológicas desse hormônio livre encontrado no plasma seminal dos varrões utilizados no  
267 presente estudo ( $3,46 \pm 0,83$  ng/mL). Nesse caso, quantidades excessivas de IGF-I pode ter  
268 ativado mecanismos de *feedback* negativo, inativando as vias de sinalização envolvidas  
269 com esse hormônio (Hadley; Levine, 1999).

270 Entretanto, mais estudos devem ser conduzidos, considerando o grau de diluição  
271 do sêmen e também a quantidade de proteínas de ligação desse hormônio (IGFBP) presentes  
272 no ejaculado. Considerando os resultados obtidos até o momento, sugere-se que o bloqueio,  
273 mas não ativação, da ação do IGF-I parece melhorar a qualidade do sêmen suíno resfriado,  
274 fato que não tem sido comprovado até então na literatura.

275 Embora a associação do GSH com IGF-I ou com anti-IGF-I tenha demonstrado

276 capacidade de melhorar o potencial antioxidante do sêmen suíno descongelado, alguns  
277 parâmetros de qualidade seminal, como a integridade de acrossoma, a atividade mitocondrial  
278 e a resistência osmótica foram prejudicadas. A resistência osmótica é uma avaliação da  
279 integridade funcional da membrana plasmática do espermatozoide, particularmente do  
280 acrossoma (Bahamondes et al., 2001). Chan et al. (1996) demonstraram que a integridade de  
281 acrossoma pode estar relacionada diretamente com a integridade de outras membranas e com  
282 a atividade mitocondrial. No presente estudo, a atividade mitocondrial foi prejudicada,  
283 podendo ser explicado devido ao bloqueio do sistema IGF-I e, conseqüentemente, menor  
284 facilitação do uso de energia e aceleração do metabolismo (Henricks et al., 1998), o que  
285 também pode explicar baixa integridade de acrossoma e em conseqüência a resistência  
286 osmótica, já que estes parâmetros citados parecem estar correlacionados (Chan et al., 1996).

287 Com relação ao sêmen fresco diluído, o aumento da resistência osmótica e do  
288 número de espermatozoides com acrossoma intacto pode estar relacionado ao efeito imediato  
289 do bloqueio do sistema IGF-I. Sabe-se que o IGF-I facilita o uso de energia (aceleração  
290 do metabolismo) pelas células espermáticas (Henricks et al., 1998). Sendo assim, a presença  
291 de IGF-I está relacionada ao metabolismo energético e, conseqüentemente, formação de ERO  
292 que podem influenciar na integridade das membranas, principalmente em suínos, cujos  
293 espermatozoides possuem maiores teores de ácidos graxos insaturados (Cerolini et al., 2000).  
294 A ausência de diferenças significativas nos níveis de peróxidos e superóxidos podem estar  
295 relacionadas às características do sêmen fresco que possuem menor acúmulo de ERO e maior  
296 capacidade antioxidante quando comparado ao sêmen resfriado por 24 horas.

297 Estudos encontrados na literatura mostram que existe correlação positiva entre a  
298 motilidade e a morfologia espermática e a concentração seminal de IGF-I no sêmen de  
299 equinos (Macpherson et al., 2002), além de melhorar diversas outras características no sêmen  
300 de bovinos (Brito et al., 2007) e búfalos (Selvaraju et al., 2009). Com suínos, a adição de IGF-

301 I reduziu a motilidade espermática do sêmen resfriado por 24 horas, porém, aumentou a  
302 motilidade quando associado à adição concomitante de vitamina E (Mendez et al., 2012).

303 A divergência nos resultados entre as diferentes espécies pode estar relacionada à  
304 concentração de receptores de membrana, à presença de proteínas de ligação (IGFBP) no  
305 plasma seminal. Em bovinos, a quantidade de receptores de membrana para IGF-I é de  
306 aproximadamente 1000 receptores em cada célula espermática (Henricks et al., 1998), porém  
307 em suínos esse número é desconhecido. Além disso, outros fatores também podem estar  
308 relacionados, tais como aqueles que influenciam o sistema antioxidante das células (Mendez  
309 et al., 2012).

310 Com relação ao sêmen resfriado por 24 horas, a adição de IGF-I ou seu  
311 anticorpo durante o processamento das doses inseminantes reduziu, aos 10 minutos de  
312 incubação, a intensidade de células com alto potencial mitocondrial. Porém, aos 120 minutos  
313 de incubação, houve aumento da porcentagem de célula com elevado potencial  
314 mitocondrial, com menor porcentagem de células com alto nível de superóxido. Esse  
315 resultado sugere que o IGF-I realmente está relacionado à ativação do metabolismo  
316 energético, em um primeiro momento, mas que o espermatozoide, a longo prazo, pode ser  
317 capaz de ativar vias metabólicas independentes do sistema IGF-I (Saltiel; Kahn., 2001).  
318 Esse resultado explica o aumento da atividade metabólica sugerida em outros estudos ao  
319 testarem a inclusão de IGF-I ao sêmen suíno (Mendez et al., 2012; Silva et al., 2011).  
320 Nesse caso, a avaliação dos mecanismos de sinalização química relacionados ao  
321 espermatozoide poderia elucidar o real mecanismo do IGF-I no metabolismo espermático.

322

## 323 **5. Conclusão**

324 A adição de 30 ng/mL de IGF-I ao meio de diluição parece bloquear em vez de ativar  
325 o sistema IGF-I do sêmen suíno. Os efeitos da adição de GSH aos meios de congelamento do

326 sêmen suíno parecem estar relacionados à presença do IGF-I no ejaculado. Embora  
327 com efeitos negativos sobre a integridade de acrossoma, maior potencial antioxidante do GSH  
328 ao sêmen suíno descongelado pode ser observado quando ocorre um bloqueio do sistema IGF-  
329 I do sêmen. A adição de IGF-I ou de seu anticorpo melhora a qualidade do sêmen fresco  
330 diluído e aumenta o potencial antioxidante tanto do sêmen resfriado quanto do sêmen  
331 descongelado, quando associado ao GSH.

332

### 333 **Agradecimentos**

334 Os autores agradecem a CAPES (PVE 88881.030399/2013-01), CNPq  
335 (446288/2014-4 e PQ 305478/2015-0), FAPEMIG (PPM-00359-14), Minitub do Brasil,  
336 Fazenda São Paulo e Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias/UFLA pelo apoio  
337 às pesquisas.

338

### 339 **Referências**

340

341 Bahamondes, L., Fazano, F., De Lucio, M. A., Neves, P. A., Bottcher, L. F., Lorenzetti, G. B.,  
342 2001. Evaluation of human sperm membrane integrity using the water test and the  
343 hypoosmotic test. *Journal of Andrology* 33, 75-77.

344

345 Baumber, J., Ball, B. A., Linfor, J. J., Meyers, S. A., 2003. Reactive Oxygen Species and  
346 cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *Journal of Andrology*  
347 24, 621-628.

348

349 Blom, E. A., 1950. A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. *Fertility*  
350 *and Sterility* 1, 176-177.

351

352 Brito, L. F., Barth, A. D., Rawlings, N. C., Wilde, R. E., Crews, D. H., Mir, P. S., Kastelic, J.  
353 P., 2007. Effect of nutrition during calfhood and peripubertal period on serum metabolic  
354 hormones, gonadotropin and testosterone concentrations, and n sexual development in bulls.  
355 *Domestic Animal Endocrinology* 33, 1-18.

356

357 Câmara, D. R., Silva, S. V., Almeida, F. C., Nunes, J. F., Guerra, M. M., 2011. Effects of  
358 antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen.  
359 *Theriogenology* 76, 342-350.

360

361 Casas, I., Sancho, S., Briz, M., Pinart, E., Bussalleu, E., Yeste, M., Bonet, S., 2010. Fertility  
362 after post-cervical artificial insemination with cryopreserved sperm from boar ejaculates of  
363 good and poor freezability. *Animal Reproduction Science* 118, 69 – 76.

364

365 Casas, I., Flores, E., 2013. Gene banking: the freezing strategy. In: Bonet, S.; Casas, I.; Holt,  
366 W. V.; Yeste, M. *Boar Reproduction*. Berlin: Springer 50, 551-88.

367

368 Cerolini, S., Maldjian, A., Surai, P., Noble, R., 2000. Viability, susceptibility to peroxidation  
369 and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Animal Reproduction Science*  
370 58, 99–111.

371

372 Chan, P. J., Corselli, J. U., Jacobson, J. D., Patton, W. C., King, A., 1996. Correlation between  
373 intact sperm acrosome using the Spermac stain and sperm fertilizing capacity. *Archives of*  
374 *Andrology* 36, 25-27.

375

- 376 Cuasnicu, P. S., Ellerman, D. A., Cohen, D. J., Busso, D., Morgenfeld, M. M., Da Ros, V. G.,  
377 2001. Molecular mechanisms involved in mammalian gamete fusion. *Archive of Medical*  
378 *Research* 32, 614-618.
- 379
- 380 Estrada, E., Rodriguez-Gil, J. E., Rocha, L. G., Balasch, S., Bonet, S., Yeste, M., 2014.  
381 Supplementing cryopreservation media with reduced glutathione increases fertility and  
382 prolificacy of sows inseminated with frozen-thawed boar semen. *Andrology* 2, 88-99.
- 383
- 384 Flores, E., Ramió-Lluch, L., Bucci, D., Fernández-Novell, J. M., Peña, A., Rodríguez-Gil, J.  
385 E., 2011. Freezing–thawing induces alterations in histone H1-DNA binding and the breaking  
386 of protein–DNA disulphide bonds in boar sperm. *Theriogenology* 76, 1450–1464.
- 387
- 388 Gadea, J., Sellés, E., Marco, M. A., 2004. The predictive value of porcine seminal parameters  
389 on fertility outcome under commercial conditions. *Reproduction in Domestic Animals -*  
390 *Zuchthygiene* 39, 303-308.
- 391
- 392 Garner, D. L., Johnson, L. A., 1995. Viability assessment of mammalian Sperm using SYBR-  
393 14 and propidium iodide. *Biology Reproduction* 53, 276-284.
- 394
- 395 Giaretta, E., Estrada, E., Bucci, D., Spinaci, M., Rodriguez-Gil, J. E., Yeste, M., 2015.  
396 Combining reduced glutathione and ascorbic acid has supplementary beneficial effects on  
397 boar sperm cryotolerance. *Theriogenology* 83, 399-407.
- 398
- 399 Gillan, L., Evans, G., Maxwell, W. M., 2005. Flow cytometry evaluation of sperm parameters  
400 in relation to fertility potential. *Theriogenology* 63, 445-1203.

401

402 Guthrie, H. D., Welch, G. R., 2006. Determination of intracellular reactive oxygen species and  
403 high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using  
404 fluorescence-activated flow cytometry. *Journal Animal Science* 84, 2089-2100.

405

406 Hadley, M. E., Levine, J. E., 1999. *Endocrinology*, 6th Edition, Benjamin Cummings: San  
407 Francisco, USA.

408

409 Henricks, D. M., Kouba, A. J., Lackey, B. R., Boone, W. R., Gray, S. L., 1998. Identification  
410 of insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa:  
411 influence on sperm motility. *Biology of Reproduction* 59, 330-337.

412

413 Hirai, M., Boersma, A., Hoeflich, A., Wolf, E., Foll, J., Aumuller, T. R., Braun, J., 2001.  
414 Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*):  
415 relation to fertility and seminal plasma growth factors. *Journal of Andrology* 22, 104-110.

416

417 Holt, W. V., 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*  
418 62, 3-22.

419

420 Jacob, C., Giles, G. I., Giles, N. M., Sies, H., 2003. Sulfur and selenium: the role of oxidation  
421 state in protein structure and function. *Angewandte Chemie* 42, 4742-4758.

422

423 Lackey, B. R., Gray, S. L., Henricks, D. M., 2002. Measurement of leptin and insulin like  
424 growth factor-I in seminal plasma from different species. *Physiology Research* 51, 309-311.

425

426 Lee, J. A., Spidlen, J., Boyce, K., Cai, J., Crosbie, N., Dalphin, M., Furlong, J., Gasparetto,  
427 M., Goldberg, M., Goralczyk, E. M., Hyun, B., Jansen, K., Kollmann, T., Kong, M., Leif, R.,  
428 McWeeney, S., Moloshok, T. D., Moore, W., Nolan, G., Nolan, J., Nikolich-Zugich, J.,  
429 Parrish, D., Purcell, B., Qian, Y., Selvaraj, B., Smith, C., Tchuvatkina, O., Wertheimer, A.,  
430 Wilkinson, P., Wilson, C., Wood, J., Zigon, R., International Society for Advancemet of  
431 Cytometry Data Standards Task, F., Scheuermann, R. H., Brinkman, R. R., 2008. MIFlowCyt:  
432 the minimum information about a Flow Cytometry Experiment. *Cytometry Part A: The*  
433 *Journal of the International Society for Analytical Cytology* 73, 926-930.

434

435 Macpherson, M. L., Simmen, R. C., Simmen, F. A., Hernandez, J., Sheerin, B. R., Varner, D.  
436 D., Loomis, P., Cadario, M. E., Miller, C. D., Brinsko, S. P., Rigby, S., Blanchard, T. L.,  
437 2002. Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-2 and 5 in  
438 equine seminal plasma: association with sperm characteristics and fertility. *Biology of*  
439 *Reproduction* 67, 648-654.

440

441 Malo, C., Gil, L., Gonzalez, N., Martínez, F., Cano, R., De Blas, I., Espinosa, E., 2010. Anti-  
442 oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after  
443 cryopreservation: Comparison between cysteine and Rosemary (*Rosmarinus officinalis*).  
444 *Cryobiology* 61, 142-147.

445

446 Mendez, M. F., Zangeronimo, M. G., Rocha, L. G., Faria, B. G., Pereira, B. A., Fernandes, C.  
447 D., Chaves, B. R., Murgas, L. D., Sousa, R. V., 2013. Effect of the addition of IGF-I and  
448 vitamin E to stored boar semen. *Animal: an International Journal of Animal Bioscience* 7,  
449 793-798.

450

- 451 Nagy, S., Jansen, J., Topper, E. K., Gadella, B. M., 2003. A triple-stain flow cytometric  
452 method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm  
453 immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biology Reproduction* 68, 1828-  
454 1835.
- 455
- 456 Pereira, B. A., Zangeronimo, M. G., Sousa, R. V., Teles, M. C., Mendez, M. F. B., Rocha, L.  
457 G. P., 2014. Effect de l'acide chlorogénique sur la peroxydation lipidique et la capacité  
458 antioxydante du sperme de verrat, In: 46<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche Porcine, 293-294.  
459
- 460 Petrunkina, A. M., Wabershki, D., Bollwein, H., Sieme, H., 2010. Identifying non-sperm  
461 particles during flow cytometric physiological assessment: a simple approach.  
462 *Theriogenology* 73, 995-1000.
- 463
- 464 Pursel, V. G., Johnson, L. A., Rampacek, G. B., 1972. Acrossome morphology of boar  
465 spermatozoa incubated before cold shock. *Journal of Animal Science* 34, 278-283.  
466
- 467 Rathi, R., Colenbrander, B., Bevers, M. M., Gadella, B. M., 2001. Evaluation of in vitro  
468 capacitation of stallion spermatozoa. *Biology of Reproduction* 65, 462-470.  
469
- 470 Roca, J., Parrilla, I., Rodriguez-Martinez, H., Gil, M. A., Cuello, C., Vazquez, J. M.,  
471 Martinez, E. A., 2011. Approaches towards efficient use of boar semen in the pig industry.  
472 *Reproduction of Domestic Animals* 46, 79-83.
- 473
- 474 Rodríguez-Gil, J. E., Rigau, T., 1996. Effects of ouabain on the response to osmotic changes  
475 in dog and boar spermatozoa. *Theriogenology* 45, 873-888.

476

477 Rodríguez-Gil, J. E., Estrada, E., 2013. Artificial insemination in boar reproduction. *Boar*  
478 *Reproduction*, 589-608.

479

480 Saltiel, A. R., Kahn, C. R., 2001. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid  
481 metabolism. *Nature* 414, 799-806.

482

483 Selvaraju, S., Reddy, I. J., Nandi, S., Rao, S. B., Ravindra, J. P., 2009. Influence of IGF-I on  
484 buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa motility, membrane integrity, lipid peroxidation and  
485 fructose uptake in vitro. *Animal Reproduction Science* 113, 60-70.

486

487 Silva, D. M., Zangeronimo, M. G., Murgas, L. D., Rocha, L. G., Chaves, B. R., Pereira, B.A.,  
488 Cunha, E. C., 2011. Addition of IGF-I to storage - cooled boar semen and its effect on sperm  
489 quality. *Growth Hormone & IGF Research: official journal of the Growth Hormone Research*  
490 *Society and the International IGF Research Society* 21, 325-330.

491

492 Sonderman, J. P., Luebke, J. J., 2008. Semen production and fertility issues related to  
493 differences in genetic lines of boars. *Theriogenology* 70, 1380–1383.

494

495 Watson, P. F., 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of  
496 spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and*  
497 *Development* 7, 871-891.

498

499 Watson, P. F., 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal*  
500 *Reproduction Science* 60-61, 481-92.

501

502 Westendorf, P., Ritcher, L., Treu, H., 1975. Zur Tiefgefrierung von Ebersperma. Labor-und  
503 Besamungsergebnisse mit dem Hu´Isenberger Paillettenverfahren. Deutsche Tierarztliche  
504 Wochenschrift 82, 261-267.

505

506 Yeste, M., Estrada, E., Casas, I., Bonet, S., Rodriguez-Gil, J. E., 2013a. Good and bad  
507 freezability boar ejaculates differ in the integrity of nucleoprotein structure after freeze-  
508 thawing but not in ROS levels. Theriogenology 79, 929-939.

509

510 Yeste, M., Flores, E., Estrada, E., Bonet, S., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J. E., 2013b. Reduced  
511 glutathione and procaine hydrochloride protect the nucleoprotein structure of boar  
512 spermatozoa during freeze-thawing by stabilizing disulfide bonds. Reproduction Fertility and  
513 Development 25, 1036-1050.

514

515 Yeste, M., Estrada, E., Pinart, E., Bonet, S., Miró, J., Rodriguez-Gil, J. E., 2014. The  
516 improving effect of reduced glutathione on boar sperm cryotolerance is related with the  
517 intrinsic ejaculate freezability. Cryobiology 68, 251-261.

518

519 Yeste, M., Fernández-Novell, J. M., Ramió-Lluch, L., Estrada, E., Rocha, L. G., Cebrián-  
520 Pérez, J. A., Muiño-Blanco, T., Concha, I. I., Ramírez, A., Rodríguez-Gil, J. E., 2015.  
521 Intracellular calcium movements of boar spermatozoa during in vitro capacitation and  
522 subsequent acrosome exocytosis follow a multiple-storage place, extracellular calcium-  
523 dependent model. Andrology 3, 729-747.

524

525 Yeste, M., 2016. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting

526 the sperm freezability in pigs. *Theriogenology* 85, 47-64.

527

528 Zangeronimo, M. G., Silva, D. M., Murgas, L. D. S., Sousa, R. V., Rocha, L. G. P., Pereira, B.

529 A., Faria, B. G., Veras, G. C., 2013. Identification of insulin-like growth factor-I in boar

530 seminal plasma and its influence on sperm quality. *Archivos de Zootecnia* 62, 411-418.

Tabela 1. Características do sêmen suíno fresco diluído 120 minutos após a adição de fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) e de anticorpo anti-IGF-I.

Variáveis	Controle	IGF-I	Anti-IGF-I	P	CV
Motilidade total, %	91,19	93,86	90,65	0,17	2,40
Velocidade média, $\mu\text{m/s}$	89,22	88,50	82,22	0,27	12,66
Velocidade linear progressiva, $\mu\text{m/s}$	22,85	22,37	22,07	0,91	16,30
Velocidade curvilínea, $\mu\text{m/s}$	43,57	42,47	41,27	0,70	10,52
Coeficiente de linearidade, %	27,77	26,46	27,96	0,67	13,02
Coeficiente de retilinearidade, %	51,32	50,47	51,01	0,93	8,96
Coeficiente de oscilação, %	51,34	49,48	51,79	0,45	7,44
Deslocamento lateral de cabeça, $\mu\text{m}$	2,45	2,37	2,30	0,36	8,56
Frequência de batimento flagelar cruzado, Hz	8,22	8,38	7,60	0,33	12,73
Anormalidades espermáticas, %	2,24	2,16	2,06	0,77	23,10
Resistência osmótica, %	72,73 b	78,59 a	78,86 a	0,02	5,16
Espermatozoides viáveis, %	70,54	69,12	69,43	0,45	2,82
Espermatozoides com acrossoma intacto, %	72,80 b	76,54 a	76,02 a	0,03	-
Espermatozoides com elevada AM, %	42,75	47,99	50,41	0,39	11,07
Intensidade de células com elevada AM	16,81	16,96	18,82	0,85	-
Espermatozoides viáveis com elevado SO, %	58,91	58,53	69,16	0,11	-
Intensidade de células com elevado SO	148,12	139,88	134,15	0,21	3,65
Espermatozoides viáveis com elevado PO, %	58,52	57,85	58,89	0,83	4,99
Intensidade de células com elevado PO	221,68	252,75	255,49	0,39	9,49
Permeabilidade de membrana intacta, %	71,97	70,80	73,21	0,25	3,23

AM: Atividade mitocondrial; SO: superóxido; PO: peróxidos.

<sup>a,b</sup> Médias seguidas por diferentes letras na coluna diferem pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ ).

Tabela 2. Características do sêmen suíno refrigerado por 24 horas a 17°C com adição de fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) e de anticorpo anti-IGF-I, mantido a 37 °C durante 10 e 120 minutos após refrigeração.

Variáveis	Sêmen suíno resfriado após 10 minutos de incubação					Sêmen suíno resfriado após 120 minutos de incubação				
	Controle	IGF-I	Anti-IGF-I	P	CV	Controle	IGF-I	Anti-IGF-I	P	CV
Motilidade total, %	84,45	84,89	86,92	0,88	4,91	86,44	84,35	82,53	0,22	–
Velocidade média, µm/s	75,35	83,09	80,91	0,29	13,79	75,06	77,40	73,83	0,73	12,9
Velocidade linear progressiva, µm/s	17,56	19,14	18,84	0,49	14,73	19,03	19,94	18,73	0,72	15,9
Velocidade curvilínea, µm/s	35,46	38,20	38,14	0,49	12,07	37,03	36,93	35,36	0,73	12,0
Coefficiente de linearidade, %	23,84	24,57	25,25	0,50	9,60	27,72	27,48	27,48	0,99	15,8
Coefficiente de retilinearidade, %	46,21	46,89	47,38	0,56	17,11	49,29	50,65	50,19	0,88	11,1
Coefficiente de oscilação, %	48,62	47,96	49,49	0,59	6,06	52,43	50,38	50,26	0,41	6,90
Deslocamento lateral de cabeça, µm	2,13	2,21	2,24	0,58	9,96	2,10	2,12	2,03	0,70	10,6
Frequência de batimento flagelar cruzado,	7,17	7,73	7,71	0,27	9,96	7,27	7,36	7,42	0,89	9,10
Anormalidades espermáticas, %	4,88	4,88	6,13	0,53	–	5,90	6,00	6,10	0,50	–
Resistência osmótica, %	71,81	75,00	70,94	0,40	8,42	70,40	72,40	68,70	0,50	9,27
Espermatozoides viáveis, %	74,86 a	74,02 ab	72,84 b	0,04	4,19	69,65	67,38	68,15	0,13	3,13
Espermatozoides com acrossoma intacto, %	76,34	77,35	76,69	0,32	1,69	74,29	75,56	76,59	0,10	3,23
Espermatozoides com elevada AM, %	71,04	67,71	61,06	0,28	4,94	57,02 b	63,86 a	61,62 a	0,04	–
Intensidade de células com elevada AM	19,60 a	16,97 b	16,70 b	0,03	–	17,83	18,18	18,16	0,81	6,57
Espermatozoides viáveis com elevado SO,	58,96	60,44	58,91	0,16	2,85	54,74	55,94	58,10	0,42	–
Intensidade de células com elevado SO	143,53	138,76	125,99	0,09	–	141,53 a	130,44 b	129,08 b	0,02	–
Espermatozoides viáveis com elevado PO,	63,32	63,03	62,73	0,88	–	61,35	60,06	61,58	0,68	6,00
Intensidade de células com elevado PO	244,64	253,17	257,05	0,22	–	223,25	207,00	211,53	0,88	–
Permeabilidade de membrana intacta, %	75,33	74,90	74,85	0,69	–	70,69	68,13	70,10	0,81	2,72

AM: Atividade mitocondrial; SO: superóxido; PO: peróxidos.

<sup>a,b</sup> Médias seguidas por diferentes letras na coluna diferem pelo teste Tukey (P<0,05).

Tabela 3. Características do sêmen suíno descongelado após a adição de fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) e de anticorpo anti-IGF-I no sêmen fresco (antes do resfriamento) e da glutatona reduzida (GSH) após o resfriamento (antes do congelamento), mantido a 37 °C durante 10 minutos após descongelamento.

Variável	Controle	IGF-I	Anti-IGF-I	GSH	GSH + IGF-I	GSH + Anti IGF-I	P	CV
Motilidade total, %	45,36	45,84	44,91	46,03	52,01	46,41	0,28	13,81
Velocidade média, µm/s	50,03	42,22	47,08	44,17	47,12	48,27	0,10	10,81
Velocidade linear progressiva, µm/s	13,77	13,55	14,20	12,62	13,89	14,22	0,61	14,27
Velocidade curvilínea, µm/s	27,77	24,51	26,49	25,36	26,33	26,96	0,27	12,14
Coeficiente de linearidade, %	30,18	34,78	31,48	31,10	31,09	33,81	0,41	15,52
Coeficiente de retilinearidade, %	46,55	52,77	49,84	47,12	51,23	51,44	0,18	11,16
Coeficiente de oscilação, %	60,44	62,53	59,77	61,55	60,97	61,33	0,82	6,68
Deslocamento lateral de cabeça, µm	1,58	1,44	1,57	1,48	1,57	1,65	0,10	9,63
Frequência de batimento flagelar cruzado, Hz	4,50	4,07	4,14	4,30	4,16	4,33	0,90	–
Anormalidades espermáticas, %	10,00	8,75	9,13	7,00	8,88	7,57	0,49	–
Resistência osmótica, %	70,94 a	68,25 a	67,69 a	67,00 a	64,31 b	62,63 b	0,03	7,61
Espermatozoides viáveis, %	53,31	51,34	51,32	47,79	42,90	39,81	0,25	12,34
Espermatozoides com acrossoma intacto, %	70,27 a	67,91 a	67,09 a	63,19 b	60,00 b	57,38 b	<0,01	7,53
Espermatozoides com elevada AM, %	31,92 a	31,08 a	28,78 ab	30,03 ab	22,74 b	22,75 b	0,04	–
Intensidade de células com elevada AM	16,18	14,86	14,81	15,49	14,75	15,05	0,21	–
Espermatozoides viáveis com elevado SO, %	30,80	33,26	33,86	32,22	28,08	25,66	0,48	16,28
Intensidade de células com elevado SO	167,64 a	157,86 b	152,95 b	137,18 c	125,99 d	114,10 e	<0,01	–
Espermatozoides viáveis com elevado PO, %	31,87 a	31,55 a	32,11 a	31,84 a	24,63 b	19,07 c	<0,01	–
Intensidade de células com elevado PO	141,65	169,61	159,64	152,22	164,24	158,69	0,41	–
Permeabilidade de membrana intacta, %	64,18	61,04	61,26	61,08	57,29	55,18	0,27	–

AM: Atividade mitocondrial; SO: superóxido; PO: peróxidos.

<sup>a,b</sup> Médias seguidas por diferentes letras na coluna diferem pelo teste Tukey (P<0,05).

Tabela 4. Características do sêmen suíno descongelado após a adição de fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) e de anticorpo anti-IGF-I no sêmen fresco (antes do resfriamento) e da glutatona reduzida (GSH) após o resfriamento (antes do congelamento), mantido a 37 °C durante 120 minutos após descongelamento.

Variável	Controle	IGF-I	Anti-IGF-I	GSH	IGF-I + GSH	Anti IGF-I + GSH	P	CV
Motilidade total, %	39,53	40,32	40,64	43,80	44,38	40,71	0,68	17,30
Velocidade média, µm/s	46,17	41,54	44,87	44,42	46,19	48,15	0,51	11,07
Velocidade linear progressiva, µm/s	13,43	12,57	13,79	13,07	13,75	13,32	0,86	15,75
Velocidade curvilínea, µm/s	24,82	23,85	25,44	24,52	25,42	25,61	0,65	–
Coeficiente de linearidade, %	32,37	35,10	33,95	32,72	32,69	30,39	0,55	15,12
Coeficiente de retilinearidade, %	51,40	52,39	52,10	51,03	50,07	49,49	0,85	–
Coeficiente de oscilação, %	58,69	62,88	61,84	60,04	62,09	57,47	0,07	6,67
Deslocamento lateral de cabeça, µm	1,51	1,45	1,50	1,44	1,44	1,58	0,11	7,35
Frequência de batimento flagelar cruzado, Hz	4,10	3,96	4,35	4,00	4,60	4,20	0,51	–
Anormalidades espermáticas, %	12,00	9,55	10,40	8,68	9,20	8,56	0,44	–
Resistência osmótica, %	65,47	61,71	62,90	62,15	61,13	62,45	0,30	–
Espermatozoides viáveis, %	47,91	49,22	47,37	42,13	39,62	38,99	0,36	14,12
Espermatozoides com acrossoma intacto, %	65,71 a	66,40 a	64,84 a	61,35 b	59,88 b	56,06 b	0,02	7,05
Espermatozoides com elevada AM, %	27,01	31,49	26,14	29,97	25,86	25,62	0,77	14,77
Intensidade de células com elevada AM	15,03	15,65	15,04	15,34	15,30	15,10	0,14	–
Espermatozoides viáveis com elevado SO, %	26,11	28,51	27,63	27,51	24,69	22,87	0,07	15,19
Intensidade de células com elevado SO	167,24 a	162,22 a	153,78 a	151,21 b	142,87 c	137,30 c	0,01	–
Espermatozoides viáveis com elevado PO, %	24,64 a	23,17 a	23,25 a	22,62 b	18,42 c	16,70 c	<0,01	–
Intensidade de células com elevado PO	147,32	145,04	148,12	144,72	140,34	156,85	0,57	–
Permeabilidade de membrana intacta, %	63,24	64,74	63,53	61,56	57,88	59,02	0,06	8,04

AM: Atividade mitocondrial; SO: superóxido; PO: peróxidos.

<sup>a,b</sup> Médias seguidas por diferentes letras na coluna diferem pelo teste Tukey (P<0,05)